



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 16/18</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/60073</p> <p>(43) 国際公開日 2000年10月12日(12.10.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01796</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月23日(23.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/93641 1999年3月31日(31.03.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2-8 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 円城寺崇(ENJOJI, Takashi)[JP/JP] 〒569-0857 大阪府高槻市玉川1-9-1-201 Osaka, (JP) 東藤直樹(TOHDOH, Naoki)[JP/JP] 〒658-0056 兵庫県神戸市東灘区御影町御影字平野1612-9 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 中村敏夫(NAKAMURA, Toshio) 〒554-0022 大阪府大阪市此花区春日出中3丁目1-98 住友製薬株式会社 知的財産部内 Osaka, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: GENE OF IRG27 POLYPEPTIDE, ANTIBODY AGAINST THE SAME AND THERAPEUTIC UTILIZATION THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 IRG27ポリペプチドに対する遺伝子、抗体、及びこれらの診断への利用</p> <p>(57) Abstract Novel diagnostics for cancer, a diagnostic method, etc. with the use of a gene encoding a polypeptide called IRG27 the expression of which is induced by the inactivation of p53 and elevated in various human cancers such as esophageal cancer, stomach cancer, lung cancer, kidney cancer, thyroid cancer, parotid cancer, ureteral cancer, bladder cancer, uterus cancer, liver cancer, mammary cancer, ovarian cancer and tubal cancer, and an antibody against IRG27.</p>		

(57)要約

p 53の不活化により発現が誘導され、かつ食道癌、胃癌、肺癌、腎癌、甲状腺癌、耳下腺癌、尿管癌、膀胱癌、子宮癌、肝癌、乳癌、卵巣癌、卵管癌等の各種ヒト癌において発現上昇が認められる、IRG27と称するポリペプチドをコードする遺伝子、及び該IRG27に対する抗体を利用した、新規な癌の診断薬及び診断方法等。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TG	トーゴ
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	ミルドヴァ	TM	トルクメニスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	US	米国
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	NZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	JP	日本	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮				
DK	デンマーク	KR	韓国				

明 細 書

I R G 2 7 ポリペプチドに対する遺伝子、抗体、及びこれらの診断への利用

5 技術分野

- 本発明は、癌抑制因子である p 5 3 が不活化した際に発現上昇する遺伝子、あるいは該遺伝子がコードするポリペプチドに対する抗体の、癌の診断への利用に関する。具体的には、p 5 3 の不活化により発現が誘導され、かつ食道癌、胃癌、肺癌、腎癌、甲状腺癌、耳下腺癌、尿管癌、膀胱癌、子宮癌、肝癌、乳癌、卵巣癌、卵管癌等の各種ヒト癌において発現上昇が認められる、I R G 2 7 と称するポリペプチドをコードする遺伝子、及び該 I R G 2 7 に対する抗体を利用した、新規な癌の診断薬及び診断方法などに関する。

背景技術

- 従来、癌の診断は、C E A や α -フェトプロテインの様に、個体発生時に産生されるタンパク質でありながら癌細胞で有意に産生上昇の認められるタンパク質を抗原とした診断法が確立されている。しかし擬陰性及び擬陽性が多いこと、並びにこれらの抗原タンパク質を産生しない癌種が存在する（例えば α -フェトプロテインは肝臓癌に限局されたタンパク質である）ことなどから、確定診断できる割合は、癌全体の 5 0 % にも満たないのが現状である。従って、より確率の高い癌の診断方法の確立が望まれている状況にあり、とりわけ悪性度の低い段階でも癌を検出する新たな診断法の確立が求められている。

発明の開示

- 本発明は、p 5 3 が不活化した際に発現上昇する遺伝子、あるいは該遺伝子がコードするポリペプチドに対する抗体を利用した、癌の診断薬及び癌の診断方法を提供することを目的とする。すなわち本発明は、p 5 3 の不活化により発現が誘導され、か

つ食道癌、胃癌、肺癌、腎癌、甲状腺癌、耳下腺癌、尿管癌、膀胱癌、子宮癌、肝癌、乳癌、卵巣癌、卵管癌等の各種ヒト癌において発現上昇が認められる、IRG 27と称するポリペプチドをコードする遺伝子、及び該IRG 27に対する抗体を利用した、新規な癌の診断薬及び癌の診断方法などを提供することを目的とする。

- 5 本発明者らは、新規な癌の診断用マーカー（腫瘍マーカー）の開発のために、癌抑制遺伝子産物であるp 53を利用することを考えた。

p 53遺伝子は、ヒトの多種の癌で最も高頻度に遺伝子変異が検出されている遺伝子である。1989年に野生型p 53遺伝子がクローン化され、その機能解析が行われた結果、野生型p 53はトランスフォーメーション（癌化）を抑制すること、及び
10 野生型p 53の導入により腫瘍原性が低下することなどの事実から、「癌細胞において欠損、不活化した遺伝子であり、しかもその正常な遺伝子は癌細胞を正常細胞に戻す働きがある遺伝子」として定義される、いわゆる「癌抑制遺伝子」の1つであることが明らかとなった（蛋白質核酸酵素、35:54-55,1990）。

p 53遺伝子は、肺癌、肝癌、膀胱癌をはじめとするあらゆる組織の癌のうちの約
15 50%において異常（多くはミスセンス変異と染色体欠失）が認められており、p 53遺伝子の異常によるp 53の不活化は、癌の発生及び進行に深く関わっていることが広く知られている（Murakami I, et al., Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 154, 1117-1123, 1996, Kang MS, et al., Int. J. Cancer, 67, 898-902, 1
20 996, Uchida T, et al., J. Urol., 153, 1097-1104, 1995）。また発癌過程では、p 53遺伝子は癌の悪性度が高まる前に異常が多く生じることが示されている（宮木 美知子等、実験医学、10、964-968、1992、Miyaki M, et al., Cancer Res., 50, 7166-7173, 1990）。更に、癌の進行にともなってp 53遺伝子の異
25 常が高頻度に認められるようになることも報告されている（Uchida T, et al., J. Urol., 153, 1097-1104, 1995）。

本発明者らはこのような、様々な癌において高頻度の遺伝子異常が見出されている

p 5 3に着目し、p 5 3 遺伝子の異常 (p 5 3 の不活化) に伴い発現上昇する因子について鋭意検討を行った。すなわち、p 5 3 を不活化させた組換え形質転換細胞で特異的に発現する遺伝子を選別した結果、複数の遺伝子の取得に成功し、これらの遺伝子の内、IRG27 (immortalization related gene 27) と命名した因子の遺伝子が、p 5 3 の不活化にともなって顕著に発現上昇しており、また各種癌細胞で発現上昇しているという知見を得た。さらに本発明者らは、癌患者24症例中17症例(約70%)において、IRG27 遺伝子が非腫瘍部に較べて腫瘍部で発現上昇していることを示す知見を得、IRG27 遺伝子を各種癌の診断に利用できることを見出した。さらに本発明者らは、IRG27 ポリペプチドに対する抗体を作製し、IRG27 ポリペプチドに対する抗体も癌の診断に有効であることを明らかにした。

ホモロジー検索の結果、IRG27 遺伝子は、インターフェロンで発現が誘導されるISG20 遺伝子と高い相同性(98.1%)を有していた。ISG20 は、PMLやSP100とともにnuclear bodyに局在することが報告されているが、その機能に関しては不明である(Gongora C, et al., J. Biol. Chem., 272, 19457-19463, 1997)。パーキットリンパ腫Daudi由来であるISG20 は、ヒト末梢血白血球由来のIRG27と比較して2アミノ酸残基欠失したタンパク質であったため、ヒト末梢血から得られたIRG27をコードする3種のクローンの塩基配列を解析した結果、何れのクローンにもアミノ酸配列に欠失は認められなかった。一方、マウス型のIRG27がヒト型のIRG27と同じアミノ酸残基数を持っていたことより、ヒト末梢血白血球由来のIRG27が本来のアミノ酸配列を有しており、癌細胞であるDaudi細胞より得られたISG20 はDaudi細胞特有のアミノ酸配列を有していると考えられた。さらに、IRG27と同一のアミノ酸配列(塩基配列は2塩基相違)を有するタンパク質として、エストロゲン刺激で遺伝子発現が誘導されるHEM45 (Pentecost BT, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 64, 25-33, 1998)も見出された。

以上のようにIRG27は、公知のタンパク質であるISO20及びHEM45と類似あるいは同一のアミノ酸配列を有するタンパク質であった。しかし、当該ISO20及びHEM45に関しては癌との関連は全く分かっていなかった。すなわちp53の不活化により発現が誘導され、種々の癌の診断に有用であることなど何ら明らかにされてはいなかった。

本発明は以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

即ち本発明は、

(1) 以下の(a)及び(b)の特徴を有する遺伝子の正鎖及び逆鎖の、少なくとも連続した17塩基の配列よりなる1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらのDNAの標識体を有効成分とする、癌の診断薬、

(a) 癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される

(b) 正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる

(2) 以下の(a)、(b)及び(c)の特徴を有する遺伝子の正鎖及び逆鎖の、少なくとも連続した17塩基の配列よりなる1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらのDNAの標識体を有効成分とする、癌の診断薬、

(a) 癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される

(b) 正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる

(c) 配列番号：14～配列番号：29いずれか記載の塩基配列を含有する

(3) 配列番号：3～配列番号：5いずれか記載の塩基配列よりなる遺伝子又はそのアレル変異体遺伝子に対するmRNAを特異的に検出し得る1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらのDNAの標識体を有効成分とする、癌の診断薬、

(4) 配列番号：3～配列番号：5いずれか記載の塩基配列よりなる遺伝子又はそのアレル変異体遺伝子の正鎖及び逆鎖の、少なくとも連続した17塩基の配列よりなる1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらのDNAの標識体を有効成分とする、癌の診断薬、

(5) ハイブリダイゼーション反応用のプローブ又はPCR反応用のプライマーであることを特徴とする、前記(1)～(4)いずれか記載の癌の診断薬、

- (6) PCR反応用のプライマーの長さが17塩基～50塩基であることを特徴とする、前記(5)記載の癌の診断薬、
- (7) 以下のA、B又はCのプライマーセット、あるいはこれらのプライマーの少なくとも17塩基以上の配列よりなる該プライマーセットを有効成分とする、前記(5)又は(6)記載の癌の診断薬、
- (A)
- 5'側プライマー配列: TGAGGGCGCAGAGGCAGGCAGCAT (配列番号: 8)
- 3'側プライマー配列: CCGAGCTGTGTCCAAGCAGGCTGT (配列番号: 9)
- (B)
- 10 5'側プライマー配列: AAAGGCAAGCTGGTGGTGGGTCAT (配列番号: 10)
- 3'側プライマー配列: CTGTCCCAAAAAGCCGAAAGCCTC (配列番号: 11)
- (C)
- 5'側プライマー配列: TTCCGCCCCTGACTTCACTTGATAACAAAC (配列番号: 12)
- 3'側プライマー配列: CAGGCCGGATGAACTTGTCGT (配列番号: 13)
- 15 (8) 以下の(a)及び(b)の特徴を有する遺伝子によりコードされるポリペプチドを特異的に認識する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体、
- (a) 癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される
- (b) 正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる
- (9) 配列番号: 14～配列番号: 29いずれか記載の塩基配列を含有する遺伝子
- 20 によりコードされるポリペプチドを特異的に認識する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体、
- (10) 配列番号: 1又は配列番号: 2記載のアミノ酸配列よりなるポリペプチド又はそのアレル変異体を特異的に認識する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体、
- 25 (11) 前記(8)～(10)いずれか記載の抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体を有効成分とする、癌の診断薬、
- (12) 前記(1)～(7)又は前記(11)いずれか記載の癌の診断薬を用いる

ことを特徴とする、癌の診断方法、

(13) 診断対象として組織又は細胞を用いることを特徴とする、前記(12)記載の癌の診断方法、

(14) 診断対象として血液、唾液を含む体液または尿を用いることを特徴とする、前記(12)記載の癌の診断方法、

(15) 固形癌を診断するための、前記(12)～(14)いずれか記載の癌の診断方法、

(16) 腎癌又は膀胱癌を含む泌尿器系の癌を診断するための、前記(12)～(15)いずれか記載の癌の診断方法、

(17) 配列番号：14～配列番号：29いずれか記載の塩基配列を含有し、かつ癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される遺伝子、ならびに

(18) 配列番号：30～配列番号：41いずれか記載の塩基配列を含有し、かつ癌抑制因子p53の不活化により発現が抑制される遺伝子、に関する。

15 本発明において癌の診断薬の有効成分とされる「DNA」とは、(a)癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される、(b)正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる、という特徴を有する遺伝子の、少なくとも連続した17塩基以上の配列よりなるDNAを指す。

ここで「(a)癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される遺伝子」は、例えば以下の工程A～Eを含む方法により単離することができる。

A. ヒト正常培養細胞株に変異型または欠失型p53遺伝子を過剰に発現させることにより、正常型p53の機能を不活化させた形質転換細胞を得る工程。

B. A. の形質転換細胞より全RNAを調製する工程。

C. 形質転換細胞由来のmRNAを鋳型としてディファレンシャルディスプレイを行うことにより、p53の不活化特異的に発現する遺伝子をPCRにより検出し、該遺伝子の塩基配列の決定を行う工程。

D. p53不活化特異的発現遺伝子の各種形質転換細胞におけるRT-PCRを行い

、発現性の確認を行う工程。

E. ヒト cDNA ライブラリーからの全長 cDNA (遺伝子) をクローニングする工程。

- 上記工程 A で用いられる変異型または欠失型 p 5 3 遺伝子は、正常型 p 5 3 遺伝子 (Mol. Cell. Biol., 7, p961 (1987)、Japanese Cancer Research Resources Bank, Deposit No. C0104) をもとにして、以下のような変異または欠失を施すことにより得ることができる。すなわち、ヒト癌で高頻度に見られる変異である第 1 7 5 番目のアルギニンからヒスチジンへの変異、第 2 4 8 位のアルギニンからトリプトファンへの変異、又は第 2 7 3 位のアルギニンからヒスチジンへの変異 (Lasky T. et al., Environ . Health Perspect., 104, 1324-1331 (1996)) などを遺伝子レベルで施すことにより、上記変異型 p 5 3 遺伝子を得ることができる。また、p 5 3 の重合 (四量体形成) に関与する領域である第 3 0 2 位～第 3 9 3 位アミノ酸残基 (Mol. Cell. Biol., 12, p5581-5592 (1992)) 以外の部分を遺伝子レベルで欠失させることにより、上記欠失型 p 5 3 遺伝子を得ることができる。ここで変異型 p 5 3 遺伝子の取得に関しては、正常型の p 5 3 遺伝子 (Japanese Cancer Research Resources Bank, Deposit No. C0104) を鋳型として、目的の部位に変異が入るように設定した 5' 側のプライマーと正常型 p 5 3 遺伝子の 3' 末端側プライマー、及び目的の部位に変異が入るように設定した 3' 側のプライマーと正常型 p 5 3 遺伝子の 5' 末端側プライマーをそれぞれ用いて PCR 反応を行い、次いでこれら 5' 側及び 3' 側の増幅断片を連結するために両断片を混合し、正常型 p 5 3 遺伝子の 5' 側と 3' 側のプライマーを用いて PCR による再増幅を行い、目的の変異型 p 5 3 遺伝子を得ることができる。また、欠失型 p 5 3 遺伝子の取得は、例えば p 5 3 の第 3 0 2 位～第 3 9 3 位を増幅するプライマーを作製し、常法により PCR 反応を行い増幅すれば良い。なおこれら変異型及び欠失型 p 5 3 遺伝子の作製にあたっては、発現ベクターに導入するために、適当な制限酵素切断部位をプライマー配列に加えることが好ましい。以上のような PCR による変異導入の他、Kunkel 法による *in vitro mutagenesis* (Methods in Enzymology, 100, p448 (1983)) によ

っても遺伝子変異の導入を行うことができる。

工程Aにおいて変異型または欠失型 p 5 3 遺伝子を過剰に発現させた形質転換細胞を得るためには、得られた変異型 p 5 3 遺伝子及び欠失型 p 5 3 遺伝子を p C A G G S (Gene, 108, p193-200 (1991)) 等の哺乳動物用発現ベクターに挿入して組換え発現ベクターを構築し、これをヒト正常培養細胞に導入し、培養を行えば良い。発現ベクターとして p C A G G S を用いる場合、形質転換細胞を薬剤添加により選択するために、プラスタサイジン S 耐性遺伝子 (b s r) を予め導入しておいても良い。導入に用いられるヒト正常培養細胞はいかなるヒト正常培養細胞であっても良いが、例えばヒト正常肺 2 倍体繊維芽細胞株である H E L 2 9 9 (大日本製薬) などが挙げられる。前記組換え発現ベクターをヒト正常培養細胞に導入する方法としては、リン酸カルシウム共沈法、リボソームを用いて DNA 分子を導入する方法 (リボソーム法、リポフェクチン法、リポフェクトアミン法、H V J - リボソーム法)、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法等の常法により行えばよい。形質転換細胞は、例えば $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ のプラスタサイジン S 等の薬剤を添加することにより選択することができる。

以上のようにして作製された形質転換細胞を培養することにより、変異型または欠失型 p 5 3 遺伝子を過剰に発現させた形質転換細胞を得ることができる。p 5 3 は四量体を形成して機能することが知られているが、形質転換細胞内で変異型または欠失型 p 5 3 を過剰に発現させることにより、正常な四量体形成が阻害され、その結果、正常型 p 5 3 の機能が不活化される。p 5 3 の機能の不活化により、ベクターのみを導入したコントロールの形質転換細胞と比較して、細胞分裂の維持が観察される。

工程Bに含まれる全 RNA の調製は、常法に従って行えば良い。例えば、S D S, N P - 4 0, T r i t o n - X 1 0 0 等の界面活性剤、もしくはフェノール存在下で細胞を処理することにより細胞を分解する方法が挙げられる。また、ホモゲナイザー等の物理的方法によって細胞を破碎し、グアニジンチオシアネートで細胞を処理した後、塩化セシウム密度勾配遠心によって全 RNA を沈澱化させる、または、グアニジンチオシアネート存在下で細胞を処理した後、酸性条件下フェノール処理 (酸性グア

ニジンチオシアン酸-フェノールクロロホルム法)することにより、全RNAを調製することができる。

工程Cに含まれるディファレンシャルディスプレイ法を用いたp53不活化細胞特異的に発現にする遺伝子の選別のためには、まず、RNAmapキット (GenHunter社) 等の市販のキットを用いて、RT-PCRにより一本鎖DNAを合成後、 $[\alpha-^{35}\text{S}]$ dATPを用いて増幅断片を標識し、6%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。電気泳動後ゲルを減圧乾固してオートラジオグラフィーを行い、正常型p53形質転換細胞 (ベクターのみを導入した細胞) よりもp53不活化細胞 (変異型または欠失型p53遺伝子導入細胞) で発現の上昇が認められたDNA、

すなわち目的とするp53不活化特異的発現遺伝子に対応するDNAを検出後、ゲルよりDNA断片を回収する。次いで、再度PCRを用いて再増幅した後に、PCR断片を回収しpT7Blue (R) T (Novagen社) 等のPCRクローニングベクターに導入し、常法に従って塩基配列の決定を行う。このようにして、p53不活化特異的に発現する遺伝子のDNA断片を取得することができる。

工程Dは、工程Cで選別されたDNAの発現性の確認に関する工程である。該工程は、得られたクローンの塩基配列をもとに適当なプライマー部分を設定し、正常型 (ベクターのみ導入)、変異型及び欠失型p53遺伝子導入形質転換細胞の全RNAを鋳型として、常法によりPCR反応を行う。PCRで遺伝子発現を検討するためには、増幅回数をコントロールする等定量的に断片を検出できる条件を設定する必要がある。その際、 $[\alpha-^{32}\text{P}]$ dCTP存在下でDNA断片を標識するか、または、プライマーの末端を標識したものをを用いてDNA断片を標識し、微量に増幅されたDNA断片を検出する方法が簡便である。このようにして設定された増幅回数は、16~22回程度が望ましい。以上のPCRを行うことにより、工程Cで取得されたDNAがp53不活化特異的に発現するDNAであることを確認することができる。

工程Eにおける全長cDNA (遺伝子) のクローニングに関しては、ヒト各種組織における発現性を検討した後、発現の認められる組織のmRNAより作製したヒトcDNAライブラリーを用い、例えば工程Cで得られたDNA断片をプローブとして、

全長cDNAをクローニングすればよい。cDNAライブラリーの作製は、組織由来のmRNAを鋳型とし、市販のcDNA合成キットを用いて行うことが可能である。また、ヒト組織由来cDNAライブラリーは、市販のものを用いることも可能である。

- 5 本発明の遺伝子は、前記(a)の特徴と共に「(b)正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる」という特徴をも有するものであるが、該特徴は、前記工程A～Eにより得られた遺伝子の適当な部分をプローブとし、同一患者の腫瘍部及び非腫瘍部より調製されたRNA（例えばInvitrogen社のHuman Tumor Panel Blots等を使用）、または患者及び健常人の同一組織
- 10 より調製されたRNAに対して、常法によりノーザンブロット解析を行うことにより調べることができる。

- 以上のようにして得られた遺伝子の、少なくとも連続した17塩基以上の配列よりなるDNAが、癌の診断薬の有効成分とされる本発明の「DNA」であり、前記遺伝子に対するmRNAの存在を特異的に検出できるものであれば、1本鎖であるか2本鎖であるかは問わず、また前記遺伝子のいかなる位置に存するいかなる長さのDNA
- 15 であっても良い。さらに、前記1本鎖または2本鎖DNAが診断可能なように標識されたものであっても良い。どのようなDNAであれば前記遺伝子の対応mRNAの存在を特異的に検出し得るかに関しては、以下に述べるようなPCR法やハイブリダイゼーション法を実際に行うことにより、容易に判断することができる。

- 20 ここで「少なくとも連続した17塩基」との限定は、確率論的に、少なくとも17塩基あれば一つの遺伝子を特定するのに充分であるという根拠に基づくものである。このようなDNAは、短いものであればDNA合成機を用いて合成され、長いものであればPCRにより、又は適当な制限酵素部位があればそれを利用することなどにより、適宜調製することができる。

- 25 本発明のDNAの具体例としては、前記(a)及び(b)の特徴を有し、かつ配列番号：14～配列番号：29いずれか記載の塩基配列を含有する遺伝子の正鎖及び逆鎖の、少なくとも連続した17塩基の配列よりなる1本鎖又は2本鎖DNA、あるいは

- はこれらの標識体が挙げられる。ここで配列番号：14～29に記載の塩基配列は、前記工程A～Eにより得られる新規な遺伝子の一部分に相当する塩基配列である。配列番号：14～29いずれか記載の塩基配列を含有する遺伝子は、前記工程A～E記載の方法に従いクローニングすることができるが、より簡便には、配列番号：14～配列番号：29記載の塩基配列の情報に基づき、該DNAの適当な部分をハイブリダイゼーションプローブに用い、当該DNAが良く発現している細胞由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることなどにより得ることができる。その際の具体的な手法は、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書を参考にして行うことができる。
- さらに、本発明のDNAの好ましい例として、配列番号：3～配列番号：5いずれか記載の塩基配列よりなるIRG27遺伝子の対応mRNAを特異的に検出し得る1本鎖又は2本鎖のDNA、あるいはこれらのDNAの標識体が挙げられる。より具体的には、前記IRG27遺伝子の、少なくとも連続した17塩基の配列よりなる1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらの標識体が挙げられる。ここで配列番号：3及び4に記載の塩基配列は、ヒトIRG27遺伝子の塩基配列であり、両者は、5'非翻訳領域中の塩基配列が一部異なる以外は同じ塩基配列を有する。配列番号：5に記載の塩基配列はマウスIRG27遺伝子の塩基配列である。これらの遺伝子は、前記工程A～E記載の方法によって得ることができる。また配列番号：3～5の配列情報に基づき適当なプローブを作製し、例えば白血球由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによっても、クローニングすることができる。さらにIRG27遺伝子は公知のHEM45遺伝子 (accession No. U88964; Pentecost BT, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 64, 25-33, 1998) と2塩基相違している (配列番号：3の第522位と第711位) のみで後は同じ配列を有しているため、該HEM45を基にしてもIRG27の遺伝子を作製することができる。

なお、前記配列番号：3～配列番号：5に記載のIRG27遺伝子には、アレル変異体や遺伝的多型の存在している可能性もあり、該アレル変異体や遺伝的多型の遺伝

子の少なくとも連続した17塩基の配列よりなるDNA及びその標識体も、癌の診断薬の有効成分とすることができる。

- 以上のような本発明のDNAは、ハイブリダイゼーション反応用のプローブ又はPCR反応用のプライマーとして癌の診断に用いられる。ここで本発明のDNAをPCRプライマーとして用いる場合の好ましい長さとしては、17塩基～50塩基程度の長さが挙げられる。またハイブリダイゼーションのプローブとして用いる場合の好ましい長さとしては、50塩基～500塩基程度の長さが挙げられる。

- PCRプライマーの具体例としては、以下のA、B又はCに記載のIRG27遺伝子由来のPCRプライマーのセット、あるいはこれらのプライマーの少なくとも17塩基以上の配列よりなるプライマーセットなどが挙げられる。

(A)

5'側プライマー配列: TGAGGGCGCAGAGGCAGGCAGCAT (配列番号: 8)

3'側プライマー配列: CCGAGCTGTGTCCAAGCAGGCTGT (配列番号: 9)

(B)

- 15 5'側プライマー配列: AAAGGCAAGCTGGTGGTGGGTCAT (配列番号: 10)

3'側プライマー配列: CTGTCCCAAAAAGCCGAAAGCCTC (配列番号: 11)

(C)

5'側プライマー配列: TTCCGCCCTGACTTCACTTGATAACAAAC (配列番号: 12)

3'側プライマー配列: CAGGCCGGATGAACCTGTCGT (配列番号: 13)

- 20 以上の本発明のDNAは、反応に支障を与えないような適当な緩衝液に溶解することにより、癌の診断薬の有効成分とすることができる。その際、測定方法に応じて、例えば逆転写酵素、Taq polymerase、dNTP、反応停止液等をも含有するキットの形態において使用することが可能である。

該診断薬を用いた癌の診断方法としては、以下の方法が挙げられる。

- 25 1) 本発明の1本鎖DNA（ペアーとなる正鎖及び逆鎖）をPCRプライマーとして用い、診断対象より採取した被験用の組織・細胞や血液、尿などから得られた全RNAまたはポリ(A)RNAを鋳型として、PCRにより診断を行う方法。

2) 本発明の1本鎖または2本鎖DNAを標識し、これをプローブとして、被験用の組織・細胞や血液、尿などから得られた全RNAまたはポリ(A) RNAに対してノーザンブロット解析により診断を行う方法。

以上の1) および2) の診断方法は、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に基づき行うことができる。

以下に具体例を示す。

1) のPCRによる診断の具体的な手法としては、例えば以下の方法が挙げられる。まず、前記本発明のプライマー用DNAを常法により合成し、これを診断薬とする。次に被験用の組織・細胞や血液、尿などより、前述の方法にて全RNA又はポリ(A) RNAを調製し、これを鋳型として、MMTV-RT等の逆転写酵素により1本鎖cDNAを調製する。当該1本鎖cDNAの調製は、例えばSuperscript pre-amplification system (Life Technologies, Gaithersburg, MD)等を用いることにより容易に行うことができる。その後、先のプライマーを添加し、常法によりPCR反応を行う。PCR反応の条件としては、例えば95℃1分、60℃1分、72℃2分を30サイクル行った後に、72℃で10分加熱するような条件が挙げられる。このPCR反応物を適当な濃度のアガロースゲルにて電気泳動することにより、IRG27のmRNAの発現の有無を検出することができる。

さらに、臨床診断の場で頻繁に用いられるPCR法に基づく測定方法としては、以下の原理に基づくものが例示される。

まず、前記と同様に血液等よりRNAの抽出・精製を行い、ビオチン化プライマーを用いた対象検体の増幅(PCR反応)を、前記と同様の手法により行う。その後、アルカリ処理により増幅産物の一本化を行い、相補的DNAプローブを固定化した固相とのハイブリダイゼーションを行う。その後固相を洗浄し、酵素標識アビジンを反応させる。固相を洗浄した後、酵素基質を添加して発色反応を行い、吸光度を測定することにより、IRG27のmRNAの有無を検出することができる。

その他、in situ PCR法(Fernandez et al., Mol. Carcinog, 20, 317-326, 1997)を用いることによっても診断を行うことが可能である。

2) のノーザンブロット解析による診断の具体的な手法としては、例えば以下の方法が挙げられる。まず本発明の1本鎖又は2本鎖DNAを放射標識やビオチン標識してプローブを作製し、これを診断薬とする。2本鎖DNAの場合は、例えば前記1)の手法により調製されたPCR反応物を、ニックトランスレーション法又はランダムプライムラベリング法などで³²P標識することなどにより作製される。次に、被験用の組織・細胞や血液、尿などより、前記と同様の手法により全RNA又はポリ(A) RNAを調製し、常法によりホルムアルデヒドゲル電気泳動及びナイロンメンブレンへのプロットを行う。このメンブレンと、先のプローブとのハイブリダイゼーションを行うことにより、IRG27 mRNAの発現の有無を検出することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、2本鎖DNAをプローブとして用いる場合、例えば50% (v/v) ホルムアミド、1M NaCl、10% (w/v) デキストラン、1% (w/v) SDS、100 µg/ml サケ精子DNAの条件で42℃、16-24時間ハイブリダイズさせた後に、2×SSC中で室温、10分間2回洗浄し、更に60℃、2×SSC、1% SDS中で20分間2回洗浄するような条件が挙げられる。

さらに、DNAチップを用いた診断も可能である。すなわちまず、DNAチップ上で本発明のDNAを合成する。次に、被験用の組織・細胞や血液、尿などより全RNA又はポリ(A) RNAを調製し、これを蛍光等でラベルする。そして、この両者をハイブリダイズさせてDNAチップ上の蛍光を検出することなどにより、癌の診断を行うことが可能である。ここで、本発明のDNAやポリヌクレオチドを結合させたDNAチップは、米国アフィメトリックス社に注文することにより入手可能であり、また、前記した診断法の個々の具体的な手段については、Nature Genetics, 21, 1-60 (1999)等を参考にして行うことができる。

なお、該プライマーおよびプローブによる検出は、診断のみならず、組織の *in situ hybridization* にも応用される。

以上述べたDNAは、p53の不活化により発現誘導される遺伝子由来のものであるが、p53の不活化により発現が抑制される遺伝子由来のDNAもまた、同様の癌

- の診断薬として利用することができる。ここでp 5 3の不活化により発現が抑制される遺伝子は、前記工程Cのディファレンシャルディスプレイにおいてp 5 3の不活化特異的に発現が抑制される遺伝子を検出すること以外は全く同様の工程A～Eを経ることにより、クローニングすることができる。このようにして見出された新規な
- 5 遺伝子の部分配列を、配列番号：3 0～配列番号：4 1に示す。

なお、本明細書において開示された配列番号：1 4～配列番号：2 9はp 5 3の不活化により発現が誘導されるDNA群であり、配列番号：3 0～配列番号：4 1はp 5 3の不活化により発現が抑制されるDNA群である。これらはいずれも新規なDNAであり、該塩基配列を含有する遺伝子もまた、本発明の範疇に含まれる。

- 10 本発明において抗体とは、前記した本発明の遺伝子によりコードされるポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する場合もある）を特異的に認識する抗体である。すなわち、（a）癌抑制因子p 5 3の不活化により発現が誘導され、（b）正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる、という特徴を有する遺伝子によりコードされるポリペプチドを特異的に認識する抗体である。具体的には、配列
- 15 番号：1 4～配列番号：2 9いずれか記載の塩基配列を含有する遺伝子によりコードされるポリペプチドを特異的に認識する抗体が挙げられ、より好ましくは、配列番号：1に記載のアミノ酸配列よりなるヒトIRG 2 7、配列番号：2に記載のアミノ酸配列よりなるマウスIRG 2 7、又はそのアレル変異体を特異的に認識する抗体が挙げられる。

- 20 これら抗体の作製は、例えば Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. ら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社（1993）などに記載の方法により容易に作製される。すなわち、本発明のポリペプチド又はその一部を免疫原に用いて常法により適宜動物を免疫することにより、本発明の抗体を作製することができる。

- 25 ここで免疫原としては、（A）本発明のポリペプチド、（B）該ポリペプチドとGST等との融合タンパク、（C）該ポリペプチドの一部よりなるオリゴペプチドとKLH等とのコンジュゲート、などが挙げられる。

- 前記 (A) のポリペプチドは、適当な発現ベクターに本発明の遺伝子を挿入し、これを大腸菌もしくは培養細胞株に導入し、これらの形質転換体より常法により当該ポリペプチドを大量に調製、精製することにより得ることができる。また前記 (B) の融合タンパクは、例えば本発明の遺伝子を pGEX-6P-1 (ファルマシア) 等の GST 融合タンパク発現ベクターに導入し、これを大腸菌に導入して形質転換体を得、その後常法により菌体を破碎、融合タンパクを抽出して、グルタチオンセファロース 4B (ファルマシア) 等により精製を行うことにより、得ることができる。また前記 (C) のコンジュゲートは、オリゴペプチド合成後、KLH や BSA タンパク質と混合することにより得ることができる。IRG27 における該コンジュゲートの具体例としては、配列番号：1 に記載のアミノ酸配列の第 104 位～127 位の部分よりなる IRG27-A、第 131 位～153 位の部分よりなる IRG27-B、第 159 位～第 181 位の部分よりなる IRG27-C の各々を KLH にコンジュゲートしたものが挙げられる。特に IRG27-C が好ましい。
- 免疫感作する動物種としては、ウサギ、マウス、ラット、ニワトリ、ウシ、ロバ、ヒツジ、ウマ等何れでも良く、また、当該ポリペプチドを特異的に認識する抗体であれば、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の何れでも良い。抗血清より精製抗体を得るためには、常法によりアフィニティー精製を行えば良い。該抗体の具体例としては、配列番号：1 に記載のヒト IRG27 のアミノ酸配列の第 159 位～第 181 位の部分よりなる IRG27-C に対する抗体が挙げられる。
- 以上のようにして得られた抗体をもとに、種々の抗体フラグメントを作製することも可能である。該抗体フラグメントとは、例えば抗体のペプシン消化によって生成され得る $F(ab')_2$ フラグメント、 $F(ab')_2$ フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって生成され得る Fab' フラグメント、および抗体をパバインおよび還元剤で処理することによって生成され得る 2Fab または Fab フラグメント等が挙げられ、これらのフラグメントも本発明の範疇に含まれる。

さらに、これらの抗体または抗体フラグメントをもとに、種々の誘導体を作製することも可能である。ここで誘導体とは、例えばキメラ抗体、擬人化抗体が挙げられ、

- 該抗体は、例えば特開昭61-47500、Nature, 321, 522(1986)等に記載の方法に準じて作製することができる。また、前記抗体または抗体フラグメントを酵素等で標識したのも、当該誘導体の範疇に含まれる。具体的な酵素標識法としては、例えばグルタルアルデヒド法、過ヨード法、マレイミド法、及びピリジル・ジスルフィド法が挙げられる。標識に用いられる酵素としては、例えばウシ小腸・アルカリフォスファターゼ、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼなどが挙げられる。これらの標識抗体は、例えば、酵素免疫測定法、医学書院（1978）等の基本書に従い、当業者ならば容易に作製することができる。さらに、前記抗体または抗体フラグメントをビオチン化したものも、当該誘導体の範疇に含まれる。
- 10 以上のような本発明の抗体、抗体フラグメント、またはこれらの誘導体は、癌の診断薬として利用することができる。本発明の代表的なタンパクである I R G 2 7 においては、ノーザンブロッティングによるRNAの検出の結果とウェスタンブロッティングによるタンパク質の検出の結果が良く一致していた。従って前記DNAと同様に、本発明の抗体、抗体フラグメント、およびこれらの誘導体を、癌の診断薬として利用
- 15 することができる。具体的には、本発明の抗体等を、例えばウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液（pH7.0）等の適当な緩衝液中に存在させることにより、癌の診断薬の有効成分とすることができる。その際、測定方法に応じて、例えば酵素標識二次抗体、発色剤、発色補助剤、停止液、標準品等をも含有するキットの形態において使用することが可能である。
- 20 本発明の診断薬を用いて免疫学的診断を行う方法としては、例えば、固形癌組織・細胞中の本発明のポリペプチドの存在を検出する方法の他、血液や唾液を含む体液又は尿中の本発明のポリペプチドの存在を検出する方法が挙げられる。すなわち、ヒト癌細胞に対して体内で細胞障害性T細胞（CTL）が誘導され、該CTLが癌細胞を傷害し、その結果、癌細胞で特異的に発現している本発明のポリペプチドが血中や尿
- 25 中に放出されるため、これら血液、唾液又は尿中での検出が可能となる。

具体的な検出方法としては、蛍光抗体法、ウェスタン・ブロット法、免疫沈降法、免疫組織染色法、放射免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（ELISA）などが

挙げられる。特に、血液や唾液を含む体液や尿に含まれる該ポリペプチドを検出する場合には、通常ELISAまたはRIA法が最も簡便である。これらの診断は、いずれも酵素免疫測定法、医学書院（1978）等の基本書に基づき容易に実施することができる。ELISA法の場合、1次抗体でプレートのコートし、試料中に存在する

5 IRG27を結合後2次抗体と反応させ、IRG27に結合した抗体を検出することが簡便である。また、抗体が認識するエピトープに対するポリペプチドまたはオリゴペプチドを用いた競合阻害による測定も可能である。

以下、IRG27を用いたELISA法の具体例につき説明する。

まず1次抗体として、抗IRG27A IgG（IRG27-A部分に対する抗体

10 ）又は抗IRG27B IgG（IRG27-B部分に対する抗体）をプレートに吸着させ、次いで、癌患者の尿（採取後、遠心し上清を集めたもの）を反応させる。その際、陽性および陰性対照についても同様の処理を施す。次いで2次抗体として、ビオチン化抗IRG27C IgG（IRG27-C部分に対する抗体）を反応させ、

15 り、IRG27を検出することができる。また、前記抗IRG27C IgGを直接ペルオキシダーゼやアルカリ性フォスファターゼ等によって酵素標識したものを用いることにより、同様の検出を行うことも可能である。

なお、組織又は細胞を用いた抗体診断では種々の固形癌を診断することが可能であり、血液や唾液等の体液または尿を用いた抗体診断では、固形癌や白血病を含む種々

20 の癌を診断することが可能である。本発明の診断方法は特に、腎癌、尿管癌、膀胱癌や尿道癌の診断に対して有効に使用される。

図面の簡単な説明

図1は、ベクターのみを導入したHEL299細胞（図中VECTOR）、及び実

25 施例1で作製した3種の変異型p53及び欠失型p53プラスミドを導入したHEL299細胞（図中175H、248W、273H及び302-393）においてディファレンシャルディスプレイを行った結果を示す電気泳動写真である。矢印のバンド

がフラグメント 27 に相当する。

図 2 は、ベクター導入細胞と 3 種の変異型 p 53 及び欠失型 p 53 プラスミド導入細胞における I R G 27 遺伝子の発現量を R T - P C R により検出した結果を示す電気泳動写真である。図中下段には、コントロールとして G 3 P D H を用いて同様の
5 実験を行った結果を示す。I R G 27 は 22 サイクル、G 3 P D H は 20 サイクルの P C R 産物を電気泳動に供した。

図 3 は、ヒト正常組織における I R G 27 遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動写真である。a, b, c の RNA ブロットはそれぞれ C l o n
t e c h 社の M u l t i p l e T i s s u e N o r t h e r n B l o t の a : H
10 u m a n、b : H u m a n I I、c : H u m a n I m m u n e S y s t e m を使用した。矢印が I R G 27 のシグナルの位置を示している。

図 4 は、ヒト各種癌細胞株における I R G 27 遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動写真である。C l o n t e c h 社の M u l t i p l e T
i s s u e N o r t h e r n B l o t の H u m a n C a n c e r C e l l L i
15 n e を使用した。図中 H L 60 は前骨髄性白血病細胞株であり、H e L a は子宮頸部癌細胞株であり、K 562 は慢性骨髄性白血病細胞株であり、M O L T 4 は急性リンパ芽球性白血病細胞株であり、R a j i はバーキットリンパ腫細胞株であり、S W 480 は大腸癌細胞株であり、A 549 は肺癌細胞株であり、G 361 は悪性黒色腫細胞株である。矢印が I R G 27 のシグナルの位置を示している。

20 図 5 は、癌患者の腫瘍部（図中 T）と非腫瘍部（図中 N）における I R G 27 遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動写真である。各レーンの上に組織名を示した。

図 6 は、肺癌患者 4 例の腫瘍部（図中 T）と非腫瘍部（図中 N）における I R G 27 遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動写真である。

25 図 7 は、抗 I R G 27 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った結果を示す電気泳動写真である。電気泳動したサンプルは、D L D - 1 細胞に I R G 27 発現ベクターを導入した安定形質転換細胞の細胞溶解液（図中 I R G 27 のレーン）、及びベ

クターのみを導入した安定形質転換細胞の細胞溶解液（図中ベクターのレーン）である。抗 I R G 2 7 抗体として、アフィニティー精製前及びアフィニティー精製後の 3 種の抗 I R G 2 7 抗体（A-2、B-2、C-2）を用いた。

図 8 は、各種ヒト細胞株における I R G 2 7 の mRNA 及びタンパク質の発現をノーザンブロッティング及びウェスタンブロッティングにより解析した結果を示す電気泳動写真である。ウェスタンブロッティングに用いたタンパク質のクマシーブリリアントブルーによる染色結果も、併せて下段に示した。図中 H E L 2 9 9 および W I 3 8 は正常肺 2 倍体繊維芽細胞株であり、H e p G 2 は肝癌細胞株であり、2 9 3 は胎児腎由来形質転換細胞株であり、H e L a は子宮頸部癌細胞株であり、S a o s - 2 は骨肉腫細胞株であり、U 9 3 7 は組織球性リンパ腫細胞株であり、R D は横紋筋腫細胞株であり、T 2 4 は膀胱癌細胞株であり、S c a B E R は膀胱癌細胞株であり、D L D - 1 は大腸癌細胞株であり、S W 4 8 0 は大腸癌細胞株であり、R a j i はパーキットリンパ腫細胞株であり、H E p - 2 は咽頭癌細胞株であり、K U - 2 は腎癌細胞株である。

図 9 は、抗 I R G 2 7 抗体を用いた E L I S A 法による I R G 2 7 の検出を示すグラフである。横軸に抗原である G S T 融合 I R G 2 7 タンパク質およびコントロールの G S T タンパク質の濃度を示し、縦軸に吸光度を示した。G S T タンパク質に対してのみ、1 m g / m l の検出抗体を用いた場合の測定値を示した。

20 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例 1

変異型及び欠失型 p 5 3 発現プラスミドベクターの構築

以下の手順により、p 5 3 のアミノ酸配列 (Mol.Cell.Biol., 7, p961 (1987)) 中の第 1 7 5 位がアルギニンからヒスチジンに変異したクローン、第 2 4 8 位がアルギニンからトリプトファンに変異したクローン、第 2 7 3 位がアルギニンからヒスチジ

ンに変異したクローンを、それぞれ作製した。これらの変異は全て、ヒトの癌で高頻度に見出されている変異である (Nuc. Acid. Res., 25, p151-157 (1997))。

- 具体的には、1. 9 K b の正常型 p 5 3 c DNA 遺伝子を含む p r o S p 5 3 (静岡県立大学・根本清光先生より分与、一般的には Japanese Cancer Research Resources Bank より Deposit No. C0 104 として入手可能)、または当該プラスミド中の E c o R I / B a m H I 切断断片に含まれる当該遺伝子を p B l u e s c r i p t I I - S K (+) (Stratagene 社製) に導入した p B S - p 5 3 を鋳型として、p 5 3 のアミノ酸配列中の第 1 7 5 位、第 2 4 8 位、又は第 2 7 3 位に変異が入るように設定した 5' 側向き (175His mut. : ATG ACG GAG GTT GTG AGG CAC TGC CCC CAT CAT G AG CGC TGC TCA GA、248Trp mut. : TGC ATG GGC GGC ATG AAC TGG AGG CCT ATC CTC ACC ATC ATC ACA CT、273His mut. : GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTA CAT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AG) と 3' 側向きのプライマー (175His A: TCT GAG CAG CGC TCA TGA T GG GGG CAG TGC CTC ACA ACC TCC GTC AT、248Trp A: AGT GTG ATG ATG GTG AGG ATA GGC CTC CAG TTC ATG CCG CCC ATG CA、273His A: CTC CCA GGA CAG GCA CAA ACA TG T ACC TCA AAG CTG TTC CGT CC)、及び正常型 p 5 3 遺伝子のオープンリーディングフレームの 3' 末端側 (p53 term: GTT AAC TCG AGT CAG TCT GAG TCA GGC CCT TCT G TC TTG AA) と 5' 末端側 (p53 Xho: GTT AAC TCG AGC CAC CAT GGA GGA GCC GCA GTC AGA TCC TAG CGT CGA GC) のプライマーとを用い、以下のようにして P C R 反応を行った。
- 20 第 1 7 5 位のアミノ酸に変異が入った p 5 3 遺伝子断片を得るため、p 5 3 X h o プライマーと 1 7 5 H i s A プライマー、1 7 5 H i s m u t プライマーと p 5 3 t e r m プライマーを用いて常法により P C R を行い、p 5 3 の 5' 側領域と 3' 側領域の DNA 断片を増幅させた。次に、アガロース電気泳動にて目的の長さの DNA 断片を精製した。得られた各々 2 種の DNA 断片及び p 5 3 X h o プライマーと p 5 3 t e r m プライマーを用いて、常法により P C R を行った。増幅された DNA 断片を 25 1 % アガロースゲル電気泳動にかけ、目的の長さの DNA 断片を回収後、X h o I で切断し、p B l u e s c r i p t I I S K (+) に導入した。第 2 4 8 位及び第 2 7

3位のアミノ酸に変異が入ったp53遺伝子断片も、対応するプライマーを用いて前記と同様にしてpBluescript IISK (+) に導入した。また、正常型p53 cDNAもオープンリーディングフレームの3' 末端側と5' 末端側にXho I 切断配列を加えたプライマー（それぞれ、p53 term および p53 Xho）を用いて増幅し、上記と同様にしてpBluescript IISK (+) に導入した。

得られた各クローンについて塩基配列を解析した結果、第175位に変異が入ったクローンのDNAは5' 側が約200bp 欠失しており、また第248位、第273位に変異が入ったクローンのDNAは5' 側が各々29bp 欠失したものであった。

そこで、p53 遺伝子内に含まれるNco I 切断部位を利用して正常型p53 遺伝子の5' 側領域部分を連結し、目的とする各変異型p53 遺伝子を得た。

以上のような変異型p53 遺伝子の他に、p53 のC末端ドメイン（核移行、四量体形成、非特異的一本鎖DNA結合ドメインが存在）のみよりなる欠失型p53 遺伝子も作製した。すなわち、p53 のアミノ酸配列の第302位の前にATGを含む領域のプライマー（pMINI : GTT AAC TCG AGC CAC CAT GGG GAG CAC TAA GCG AGC ACT GCC CAA CAA CA）を設定し、該プライマーと、正常型p53 遺伝子のオープンリーディングフレームの3' 末端のプライマー（p53term）とを用いてPCRを行った。上記と同様に得られた断片をpCAGGS (Gene, 108, p193-200 (1991)) に組み込み、目的のクローンを13種得た。その中の1種の塩基配列を決定した結果、目的のクローンであることが確認された。

以上のようにして得られた変異型p53 DNAを含むpBluescript I I組換えベクター及び欠失型p53 DNAを含むpCAGGS組換えベクターをXho I で切断し、インサートDNAを分離した。これらインサートDNAをpSV2-b sr（科研製薬社）のプラスミドサイジンS耐性遺伝子（b sr）発現ユニットを含むPvu II-EcoRI DNA断片をpCAGGSベクターのSal I 部位へ挿入して作製したpCAGGS-b srのXho I 部位にそれぞれを導入した。得られたクローンのうち175アミノ酸残基がアルギニンからヒスチジンに変異したクロ

ーンをpCAGGS-b s r-175H、248アミノ酸残基がアルギニンがトリ
プトファンに変異したクローンをpCAGGS-b s r-248W、273アミノ
酸残基がアルギニンがヒスチジンに変異したクローンをpCAGGS-b s r-27
3H、302～393アミノ酸残基部分よりなる欠失型p53クローンをpCAGG
5 S-b s r-p53-302-393と命名した。その後、これらのプラスミドで大
腸菌（JM109、東洋紡）を形質転換した。

実施例2

形質転換細胞の作製とRNA調製

- 10 3種の変異型p53プラスミド（pCAGGS-b s r-175H、pCAGGS
-b s r-248W、pCAGGS-b s r-273H）及び欠失型p53プラスミ
ド（pCAGGS-b s r-p53-302-393）をそれぞれ200 μ gずつ、
0.4mlのPBS（-）に懸濁したエレクトロポレーターSSH-10（島津機器
社製）を用いて 2×10^6 のヒト正常肺2倍体繊維芽細胞（HEL299細胞、
15 大日本製薬社）にエレクトロポレーションにより導入した。印加条件は300V、0
.75kV/cm、パルス幅1000 μ s、パルス数6回で行い、24時間後に2 μ
g/mlのブラストサイジンSを添加した培養液で選択した。選択開始5日後以降の
生き残った形質転換細胞を回収した。なおコントロールとして、ベクター（pCAG
GS-b s r）を導入した同様の細胞も調製した。
- 20 175アミノ酸残基目に変異の入ったp53遺伝子（pCAGGS-b s r-17
5H）及び欠失型p53遺伝子（pCAGGS-b s r-p53-302-393）
を導入した細胞では、ベクター（pCAGGS-b s r）を導入したコントロール
細胞と比べて細胞分裂の強い維持が観察された。一方、248、273アミノ酸残基
目に変異が入ったp53遺伝子（pCAGGS-b s r-248W、pCAGGS-
25 b s r-273H）を導入した細胞も、コントロール細胞よりも細胞分裂の維持が高
い傾向であった。

また、これら変異型及び欠失型p53遺伝子を導入した細胞では、p53に対する

抗体を用いたウェスタンブロット解析により、導入した遺伝子より産生されたと考えられるタンパク質が過剰に発現していることが確認された。

以上の解析結果より、変異や欠失を導入したp 5 3 遺伝子の過剰発現によりHEL 2 9 9細胞の中で正常なp 5 3の機能が不活化され、その結果、細胞分裂の維持が引き起こされたことが考えられた。

その後、回収した形質転換細胞に0. 5 %NP-4 0、1 0mM Tris-HCl (pH8. 6)、1 4 0mM NaCl、1. 5mM MgCl₂、1 0 0 0 U/ml RNase inhibitorを加え、懸濁後遠心により上清を回収し、等量の0. 2M Tris-HCl (pH7. 5)、2 % SDS、2 5mM EDTA、0. 3M NaCl、2 0 0 μg/ml Proteinase Kを加え、3 7℃で3 0分加温した。等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（2 5：2 4：1）を加えて抽出後、エタノール沈殿にて全RNAを回収し、以下の実験に用いた。

15 実施例3

ディファレンシャルディスプレイ法によるp 5 3不活化細胞特異的発現遺伝子の選別

GenHunter社のRNAmapping kit A～Dのプロトコールに従い、実施例2で得られた形質転換細胞由来の全RNAを鋳型としてRT反応を行った。次いで、計80通りの全てのプライマーセットを用いてPCRを行った。PCR反応は、Perkin Elmer社製のGeneAmp PCR system 9600を用い、94℃x20sec-48℃x1min-72℃x30secを10サイクル、94℃x20sec-40℃x1min-72℃x30secを35サイクル行い、72℃で5min加熱後、4℃に冷却した。

熱処理したPCR溶液を6 %シークエンス変性ゲル (Long Ranger 6 % premix gel ; FMC社) で電気泳動し、減圧乾固後にX線フィルム (Bio Max MR ; Kodak社) を2～3日間感光させた。オートラジオグラフィの結果を図1に示す。

- p 5 3 不活化細胞特異的に出現するDNA断片の他に、p 5 3 不活化に伴って発現が減少するDNA断片の検索も併せて行い、オートラジオグラムの目的のバンドと一致した乾固したゲル部分を切り出した。選別した各DNA断片の各種形質転換細胞における発現の強弱を表1に示す。切り出した各ゲル部分を100 μ lの水に10
- 5 分間浸した後100℃で15分間加熱し、遠心後、上清に50 μ gのグリコーゲンを加えエタノール沈殿によって増幅産物を回収した。回収されたDNA溶液を用いてPCRにより再増幅し、SUPREC-02限外濾過膜遠心チューブ（Takara社）でDNA断片を精製後、プラスミドベクターpT7Blue（R）（Novagen社）に挿入した。

表1

Fragment No.	Signal Strength				
	Vector	175H	248W	273H	302-393
1	-	+	++	+	++
2	+++	+++	++	++	+++
3	+-	+-	+	+-	+
4	+-	+-	+	+-	+
5	-	+	+-	+	+
6	-	+	-	-	-
7	+	+	+-	+-	+
8	+-	+-	+	+-	+
9	-	-	+	+-	+-
10	+	+	-	+	+
11	-	++	++	+	-
12	+	+	+-	+	+
13	+	+	+	+	-
14	+	+	++	++	+
15	+	++	+-	+-	+
16	-	+	-	+-	++
17	++	++	-	+	++
18	+	+	+-	+-	+
19	++	++	-	+	++
20	++	+	+	+	+
21	++	++	-	-	+
22	+	++	+	+	++
23	++	++	++	+	++
24	+	++	+	+	+
25	+-	+	+	+	+
26	+	+	++	+	+
27-1	-	-	+	+	+-
27-2	-	-	+	+	+-
28	++	++	+	+	++
29	+-	+	++	++	+
30	+-	+-	+	+	+-
31	+-	+	+-	+-	+-
32	+	+	++	+	++
33	++	++	+	+	++
34	++	++	+-	+	++
35	+	++	+	+	++
36	+	+	+	+	++
37	+	+	++	+	++
38	+	++	+	+	++
39	++	++	+	+	++
40	+	+	++	++	+
41	++	++	+	+	++
42	+	+-	+-	+-	+-
43	+-	+-	+	+	+-
44	++	++	+	++	+
45	++	++	++	++	+
46	++	++	+	+	++
47	++	++	+	+	++
48	+-	+-	+	-	++
49	+	+	+-	+-	+-
50	+	+-	+	-	+
51	+	+	++	+	++
52	++	++	+	+	+
53	+-	+-	+-	+	+-
54	-	-	+-	-	+
55	-	-	-	+	-
56	-	+-	+	+-	+-
57	-	-	-	+-	+
58	-	+-	+	+-	+
60	+-	+	++	+	+-
61	++	+	+-	+-	-
62	++	++	+	+	++
3C-1	+	+-	++	+-	++
3C-2	+	+	++	+	++

Signal Strength: 各周波数帯域の信号の強さを示す

++が強い信号、+が弱い信号、-が信号がない、+-が信号が非常に弱いことを示す

得られた64種の断片を含むクローン群の塩基配列の決定を行い、GenBank/EMBL遺伝子データベース(DNASIS CD-ROM 033; 日立ソフトウェアエンジニアリング社)によってホモロジー検索を行った結果、新規あるいは公知の種々の遺伝子が同定された。結果をまとめて表2に示す。表中の「Novel」が新規な遺伝子に相当する。これら新規な遺伝子のうちp53不活化細胞特異的に出現するDNAの塩基配列を配列番号: 14~29に、またp53不活化に伴って発現が減少するDNAの塩基配列を配列番号: 30~配列番号: 41に記載した。

なお、p53の不活化によって発現が減少する遺伝子群の中に、p53によって遺伝子の発現が誘導されるp21WAF-1が選別されていたことより(フラグメント61に相当)、本発明で用いたディファレンシャルディスプレイの実験条件は、p53の不活化によって発現が上昇あるいは減少する遺伝子群を解析するのに適したものであると判断された。

これらのDNA断片の中でp53不活化細胞特異的に最も顕著に発現上昇が認められたのは、フラグメント27のDNAであった。

表 2

Fragment No.	SEQ ID No.	Fragment size (bp)	Homologous by computer search
1	14	197	Novel
5	15	335	Novel
6	16	254	Novel
10	30	111	Novel
11		326	T/A stretch ^a
16		97	Ribosomal protein L12
21	31	206	Novel
22		150	Na,K ATPase β -subunit
25	17	92	Novel
26		121	Novel ^b
27-1		121	Novel ^b
27-2	18	121	Novel ^b
29		121	Novel ^b
30 ^c		338	p57kip2-XPC fusion ^d
		>290	T/A stretch ^a
32		258	Phorbollin I
33		217	p57kip2
34	32	148	Novel
42		172	Rab13
49	33	273	Novel
53		326	Signal recognition particle 9
54	19	346	Novel
57	20	153	Novel
61		123	p21waf-1
2	34	208	Novel
8	21	139	Novel
9		107	myc related zinc finger mRNA
12	35	206, 97	Novel, DAD
14	22	111	Novel
19	36	208, 173	Novel, c-myc
20	37	200, 248	Novel, lysil oxidase
23		258	KAP1
24		135	Ribosomal protein L32
28		201, 208	mitochondria gene, PLA ₂
31	23	175, 320	Novel, Phorbollin I
35	24	313	Novel
36		187	KIAA
37		155	α -tubulin
38	25	89	Novel
41		96, 171	Rab 13, Cystathionine β -synthase
43		96, 153, 133	Rab 13, IFN-inducible 66kDa, MHC I
44	38	103	Novel
46	39	307	Novel
47	40	202	Novel
50	41	264	Novel
51	26	132	Novel
60	27	88	Novel
62		59	IGF-BP5
3C-1	28	209	Novel
3C-2	29	232	Novel

a) A/Tが連続した塩基配列 (artifact)
 b) 同一遺伝子 (F27=フラグメント27)
 c) 338bp=6clones, >290bp=3clones
 d) artifact

実施例 4

フラグメント 27 に対応する遺伝子の形質転換細胞での発現性の検討

フラグメント 27 に対応する遺伝子が p 53 不活化細胞において顕著に発現上昇していることを確認するために、以下の実験を行った。

PCR によるフラグメント 27 対応遺伝子の適切な増幅条件を検討するためのコントロールとして、G 3 PDH 遺伝子検出用の市販のプライマー (Clontech 社製) を用いて、各形質転換細胞全 RNA を鋳型とし、RT-PCR を行った。プライマーの 5' 末端を ^{32}P で標識し、増幅のサイクル数を 16、18、20、22 回と変化させた。PCR 溶液を電気泳動し、増幅された DNA 断片のシグナル強度を測定した結果、16 から 22 サイクルで何れの形質転換細胞を用いた場合でも、G 3 PDH の DNA 断片が対数増幅していることが示され、RT-PCR に用いる全 RNA サンプルがほぼ等量であることが確認された。

フラグメント 27 に対応する DNA 配列を EST データベースより見出し (accession No. AA150500 及び accession No. AA156704)、これらよりフラグメント 27 に対応する遺伝子の特異的に検出できるプライマー配列を選定し、同様の RT-PCR を行った。18 から 22 までサイクル数を増加させた場合、対数増幅していることが示された。用いたプライマーは以下の通りである。

- (1) 5' 側のプライマー配列: GCATGGCTGGGAGCGTGATGTGGT (配列番号: 6)
(2) 3' 側のプライマー配列: CTCTTGTGCAGGAGGCGCTCACTCAG (配列番号: 7)

p 53 不活化形質転換細胞から得られた全 RNA を鋳型とした 22 サイクルの増幅を行った RT-PCR の結果を図 2 に示した。何れの p 53 不活化細胞においてもフラグメント 27 対応遺伝子の発現の顕著な上昇が認められた。フラグメント 27 に相当する遺伝子を不死化関連遺伝子 IRG 27 と命名した。

実施例 5

IRG27 遺伝子の発現性の検討

IRG27 全長の cDNA をクローニングするためのライブラリーのソースを決定するために、ノーザンブロット解析によりヒト正常組織及び癌細胞株での IRG27 の発現性を検討した。プローブとして用いる DNA を取得するため、IRG27 を

5 特異的に検出するプライマーを用いて目的の DNA 断片を増幅後、pT7Blue (R) (Novagen 社) にクローニングした。プライマーの塩基配列は以下の通りである。

(1) 5' 側のプライマー配列: TGAGGGCGCAGAGGCAGGCAGCAT (配列番号: 8)

(2) 3' 側のプライマー配列: CCGAGCTGTGTCCAAGCAGGCTGT (配列番号: 9)

- 10 増幅されクローニングされた遺伝子断片は、制限酵素で組換えプラスミドベクターから切り出し、Prep A gene (BioRad 社) によって精製後、BcaBEST DNA ラベリングキット (Takara 社) を用いて [α - 32 P] dCTP により標識し、プローブとした。

- 各種組織及び細胞由来の RNA がブロットされたフィルターは、Clontech
- 15 社より購入したものを用い、常法によりノーザンブロット解析を行った。各種ヒト正常組織での発現性を検討した結果を図 3 に示す。末梢血白血球、脾臓、胸腺、骨髄等のリンパ系組織で IRG27 の強い発現が認められた。リンパ系組織以外の組織では小腸で比較的強い発現が認められたが、これは、小腸が独自の免疫組織 (リンパ球) を保有していることに起因しているとも考えられる。以上の組織を除くヒト正常組織
- 20 では、IRG27 は発現していないか、発現していても極めて低い発現量であった。なお、mRNA のサイズは 0.9 Kb であり、1.8 Kb、3 Kb、4.5 Kb の転写産物も弱いながら検出された。

- 各種ヒト癌細胞株での発現性を検討した結果を図 4 に示す。調べた殆どの癌細胞株で発現が認められた。特にリンパ腫由来の細胞株 (Raji) で高頻度の発現が認め
- 25 られ、大腸癌細胞株 (SW480) や子宮頸部癌細胞株 (HeLa) でも強い発現が認められた。さらに、胎児肝組織では発現が強かったのに対し、成人肝での発現が極めて低いという結果も得られた (図 3)。このことは、IRG27 遺伝子が腫瘍マー

カーのCEAと同様に癌化と密接に関わっていることを示唆するものである。

実施例 6

IRG27の全長cDNAのクローニング

- 5 上記の実験から、IRG27に対応する遺伝子は末梢血白血球で非常に高い発現が認められたので、ヒト白血球cDNAライブラリー (Gibco BRL社) を用いてIRG27 cDNAのスクリーニングを行った。2.7 x 10⁶コロニーに対して実施例5で作製したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、3回のスクリーニングにより8クローンが選別された。
- 10 1Kbの挿入配列を有するIRG27-3-1、IRG27-4-1、IRG27-9-1の3つのクローンについて全塩基配列を決定した。その結果、3種のクローンは有する181アミノ酸残基に対応するオープンリーディングフレーム部分は同一であった。しかしながら、IRG27-4-1の開始コドンの5'上流部分は、IRG27-3-1及びIRG27-9-1とは異なる配列であった。クローンIRG27-3-1及びIRG27-4-1に含まれる塩基配列を配列番号：3及び4に示した。また、これらの塩基配列より推定されるアミノ酸配列を配列番号：1に示した。
- 15 なお、染色体DNAを鋳型としたPCRにより、上記DNAの配列の違いは、alternative splicingによって生じたものであることが予想されている。
- 20 GenBank/EMBL遺伝子データベース (DNASIS CD-ROM 035; 日立ソフトウェアエンジニアリング社) でホモロジー検索した結果、本発明のIRG27のアミノ酸配列に対して2アミノ酸残基の欠失が認められるポリペプチドをコードするISG20遺伝子 (accession No. X89773; Gongora C, et al., J. Biol. Chem., 272, 19457-19463, 1997)、及び、本発明のIRG27のcDNAに対し2塩基の置換が認められるがアミノ酸配列は同一であるHEM45遺伝子 (accession No. U88964; Pentecost BT, J. Steroid Bioch
- 25

em. Mol. Biol., 64, 25-33, 1998)が見出された。HEM 45の5'末端領域の塩基配列は、IRG27-3-1タイプであることが明らかとなった。

- 5 以上のようにIRG27は、HEM45と同一のアミノ酸配列を有し、またISG20と2アミノ酸残基の相違するタンパクであることが明らかとなった。HEM45は、エストロゲンにより発現上昇することが知られており、またISG20はI型及びII型インターフェロンにより発現上昇することが知られている。しかし、p53の不活化により発現上昇するという特徴を有することは、何ら知られていない。

10 実施例7

マウス型IRG27のクローニング

- マウス型IRG27 (mIRG27) 遺伝子の一部配列は、ESTデータベースから推定されたが、hIRG27のオープンリーディングフレームに対応する領域内に塩基の欠失があり、そのままアミノ酸配列に翻訳するとmIRG27遺伝子のコード
15 するタンパク質はhIRG27タンパク質と比較してC末端が欠失したポリペプチドとなる。そこで、mIRG27遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を明らかにする目的で、ESTデータベースの塩基配列に基づきプライマーを設定し、マウス脾臓cDNAライブラリー (Clontech社) を鋳型としたPCRによりDNA断片を増幅し、pGEM-T Easy Vector (Promega社) に導
20 入した。その結果、8種のクローンが得られ、その内2種の全塩基配列の決定を行った。また、増幅したPCR断片を用いた直接法による塩基配列の決定も行い、mIRG27 cDNA遺伝子の正しい塩基配列を決定した。

- 決定された塩基配列をESTデータベースより得られた配列と比較したところ、4カ所で置換、欠失、挿入があることが明らかとなった。mIRG27遺伝子とhIR
25 G27遺伝子のオープンリーディングフレーム領域の相同性は83.2%であり、遺伝子の塩基配列より推定されたmIRG27タンパク質とhIRG27タンパク質のアミノ酸配列の相同性は82.3%であった。またhIRG27と同じくmIRG2

7も181アミノ酸であった。決定されたmIRG27の塩基配列を配列番号：5に、また推定されるアミノ酸配列を配列番号：2に示した。

実施例8

5 IRG27の癌組織での発現の検討

IRG27の癌組織での発現の検討を行うため、同一患者の腫瘍部・非腫瘍部組織より調製されたRNAを用いてノーザンブロット解析を行った。プローブとしてhIRG27 cDNA（配列番号：3）のNcoI-SacI断片を用い、前記腫瘍部・非腫瘍部組織のRNAのプロットされたHuman Tumor Panel B
10 lots（Invitrogen社）を使って常法によりハイブリダイゼーションを行った。結果を図5及び図6に示す。IRG27は、高頻度に腫瘍部での遺伝子発現の上昇していることが明らかとなった。腫瘍部でのIRG27遺伝子の発現の増加度と癌腫を比較した結果、70%の癌腫でIRG27の発現が上昇していることが明らかとなった。具体的には、食道癌、胃癌、肺癌、腎癌、甲状腺癌、耳下腺癌、尿管癌
15 、膀胱癌、子宮癌、肝癌、乳癌、卵巣癌、卵管癌でIRG27の発現が上昇していた。また、肺癌患者4症例中3症例で（図6）、腎癌患者2症例中全症例で（図5）、IRG27の発現上昇が認められた。腫瘍部における発現上昇に関して表3及び表4にまとめた（表中、↑が多いほど非腫瘍部より腫瘍部での発現の程度が高いことを、→は腫瘍部と非腫瘍部との間の発現差が少ないことを、↓は腫瘍部での発現が非腫瘍部より少ないことを示す）。表3は図5の結果に、表4は図6の結果に、それぞれ対
20 応している。

表3

癌患者 20 例における IRG27 の発現性				
腫瘍部での発現程度	↑↑	↑	→	↓
腫瘍部 (症例数)	食道 胃 耳下腺 膀胱(リンパ腫)	肝臓 胃 腎臓(2) 甲状腺 尿管 乳 子宮 卵管 卵巢	脳 副腎 肺 直腸 リンパ節	大腸
症例数(%)	4 (20%)	10 (50%)	5 (25%)	1 (5%)

表4

肺癌患者 4 例における IRG27 の発現性				
腫瘍部での発現程度	↑↑	↑	→	↓
症例数(%)	—	3 (75%)	—	1 (25%)

- 5 以上のように、p 5 3 の不活化にともない発現が上昇する遺伝子としてクローニングされた I R G 2 7 遺伝子の発現上昇は、70%程度の腫瘍部で認められたが、この値は、癌患者において p 5 3 が変異している割合（約50%、Cell, 88, p323-331 (1997)) より高い値であった。また、図5に示された20症例の中で非腫瘍部ではほとんど発現がなく腫瘍部で発現が認められた症例に限定すると、20症例の内、腎癌
- 10 (2症例)、肝癌、甲状腺癌、耳下腺癌、尿管癌、膀胱、子宮癌、卵巢癌でその傾向は顕著であった。頻度は45%であった。

結果として、検討した症例では、癌における p 5 3 変異の診断率以上に癌を検出できることが示された。癌の診断薬として p 5 3 自身を利用した場合、p 5 3 の変異により p 5 3 の発現が認められなくなった患者の診断までは行うことができない。本発明の I R G 2 7 を利用することにより、このような患者の診断をも行うことが可能であり、従って癌の診断薬として p 5 3 を利用するよりも、I R G 2 7 を利用したほうがより有用であることが考えられた。

15

実施例 9

h I R G 2 7 ポリペプチドに対する抗体の作製

I R G 2 7 タンパク質を検出する抗体を作製するため、配列番号：1 に記載の h I
5 R G 2 7 のアミノ酸配列の中から 3 カ所の領域を選定し、オリゴペプチドを合成した。
具体的には、配列番号：1 に記載のアミノ酸配列の第 1 0 4 位～1 2 7 位の部分よりなる I R G 2 7 - A、第 1 3 1 位～1 5 3 位の部分よりなる I R G 2 7 - B、第 1 5 9 位～第 1 8 1 位の部分よりなる I R G 2 7 - C の 3 種のオリゴペプチドを合成した。次いで、オリゴペプチドを K L H にコンジュゲートし、これを抗原に用いて常法
10 によりウサギを免疫し、ウサギ抗血清を調製した。調製した 6 種の抗血清は何れも I R G 2 7 タンパク質を認識した。

次に、2-フルオロ-1-メチルピリジニウムトルエン-4-スルホン酸活性化セルロファイン（生化学工業社）をペプチド固定化アフィニティーカラムの担体として使用し、先に抗原として使用したオリゴペプチドを該担体に結合させた。次に、先に
15 調製した抗血清 I R G 2 7 A-1 及び 2、I R G 2 7 B-1 及び 2、I R G 2 7 C-1 及び 2 のうち、抗血清 I R G 2 7 A-2、I R G 2 7 B-2、I R G 2 7 C-2 の各々 9 m l をアフィニティーカラムに添加し、転倒混和した。その後 4℃で一晩放置し、TBS で洗浄後、0.1 M グリシン-HC l (pH 2.5) で溶出した。アフィニティー精製後の抗体の I g G 量を測定したところ、抗 I R G 2 7 A-2 I g G
20 、抗 I R G 2 7 B-2 I g G、抗 I R G 2 7 C-2 I g G は、各々およそ 0.2 m g / m l、1 m g / m l、0.2 m g / m l であった。抗血清及び精製した抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果を図 7 に示す。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供したタンパク質は、p c D N A 3.1 (+) (I n v i t r o g e n 社) に I R G 2 7 遺伝子を挿入した組換えプラスミド DNA を D L D-1 細胞（大日本製
25 薬社）にトランスフェクトして得られた安定形質転換細胞の細胞溶解液、及び、ベクターのみを導入した安定形質転換細胞の細胞溶解液である。図 7 より明らかなように、特に抗 I R G 2 7 C-2 I g G は抗血清に較べ特異性が非常に高まっており、ウ

エスタンプロットに使用する抗体として最適であると考えられた。

実施例 10

抗体を用いた I R G 2 7 の検出

- 5 正常細胞である H E L 2 9 9 と W I 3 8、胎児腎由来形質転換細胞である 2 9 3 及び各種の癌細胞から得られた RNA 及びタンパク質を用いて、遺伝子の発現性とタンパク質の産生性に相関性が認められるかについて検討した。

1) ノーザンブロッティング

- 各種細胞からの全 RNA の調製は、G I B C O - B R L 社の Trizol キットを用いて
10 行った。20 μ g の全 RNA をホルマリン含有 1 % アガロースゲル電気泳動にかけ、N E N 社のナイロンメンブレン (Gene Screen Plus) に転写後、1 M N a C l、10 % デキストラン、1 % S D S、50 % ホルムアミド、100 μ g / ml サケ精子 DNA を用いてプレハイブリダイゼーションを行った。T a k a r a 社の B c a B E S T L a b e l l i n g K i t を用い³²P で標識した I R G 2 7
15 c D N A (配列番号: 3) の N c o I / S a c I 断片をプローブとし、常法によりノーザンハイブリダイゼーションを行った。洗浄は室温で 10 分間 2 x S S C で 2 回、60 °C で 20 分間 2 x S S C、1 % S D S で 2 回、次いで室温で 10 分間 0.1 x S S C、0.1 % S D S で 1 回を行った。検出は、コダック社の B I O M A X M S フィルムを用いて行った。

20 2) ウエスタンプロッティング

- 細胞からのタンパク質の調製は、31.25mM Tris-HCl (pH6.8)、7.5% グリセロール、2% S D S で細胞を溶解することにより行い、Pierce 社の B C A タンパク質測定キットを用いてタンパク質濃度を決定した。10 μ g のタンパク質溶液に 5 % (V/V) 2 -メルカプトエタノール、0.01% (W/V) B P B を加え、100 °C で 5 分間加熱後、15% S D S -
25 ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。電気的にミリポア社の PVDF メンブレン (イモビロン P) に転写後、1% 正常ヤギ血清 (Vector 社) 含有 T B S - T (20 mM T r i s H C l (pH7.5), 150 mM N a C l, 0.05 % (v/v) T

ween 20) 溶液でブロッキングし、200倍希釈のアフィニティー精製抗 I R G 2 7 抗体 (抗 I R G 2 7 C-2 I g G) を反応させた。次いで、5000倍希釈した 2 次抗体 (カップル社の H R P 標識抗ウサギ I g G ヤギ抗体) を反応させ、アマシャム社の ECL Plus で I R G 2 7 を検出した。

5 3) 結果

図 8 に示されるように、ノーザンブロッティングによる RNA の検出の結果とウェスタンブロッティングによるタンパク質の検出の結果は良く一致していた。なお、m RNA の発現が認められなかった DLD-1 細胞でタンパク質が検出されなかったが、CBB 染色の結果が示すように電気泳動にアプライされたサンプル量が少なかったためと考えられる。以上の様に、作製した抗 I R G 2 7 抗体は、I R G 2 7 を定量的に検出できることが示された。

実施例 1 1

抗 I R G 2 7 抗体を用いた E L I S A 法の確立

15 血液や唾液を含む体液や尿中に存在する I R G 2 7 タンパク質の検出を行うために、抗 I R G 2 7 抗体を用いたサンドイッチ E L I S A 法を確立した。

本実験で用いる I R G タンパク質は、以下の如き G S T との融合タンパク質として調製した。すなわちまず、実施例 6 でクローニングされたヒト I R G 2 7 (配列番号 : 3) の c D N A を p G E X - 6 P - 1 (ファルマシア) のクローニング部位に読み
20 枠が合うように挿入し、G S T 融合 I R G 2 7 タンパク質発現プラスミドを作製した。次にこの発現プラスミドで宿主大腸菌 J M 1 0 9 (東洋紡) を形質転換した後、3 7 ° C で培養し、O D 6 0 0 が約 1. 1 の時点で 0. 1 m M I P T G を添加して 1 時間培養後、菌体を回収した。菌体を 1 m M P M S F と 1 μ g / m l ペプスタチン A 、および 1 μ g / m l ロイペプチンを含むバッファー P B S - E (P B S 、 5 m M
25 E D T A) に懸濁し、超音波破碎後、可溶化処理として最終濃度 1 % になるように T r i t o n X - 1 0 0 を加えた。この可溶化菌液を遠心して上清を回収し、その上清にグルタチオンセファロース 4 B (P h a r m a c i a) を加え、G S T 融合 I R G

27タンパク質を結合させた。グルタチオンセファロースをPBS-Eで3回洗浄し、10mM還元型グルタチオンを含む50mM TrisHCl(pH8.0)バッファーでGST融合IRG27タンパク質を溶出した。精製したGST融合IRG27タンパク質をProtein Assay Kit (BIORAD)を用いて定量した。

- 5 以上のようにして作製したGST融合IRG27と抗IRG27抗体とを用い、以下のようにしてELISA法を確立した。

- まず、実施例9で作製した抗IRG27B-2 IgGを96穴プレートであるイムノプレートII (Nunc社)に吸着させた後、先に調製した種々の濃度のGST融合IRG27を反応させた。続いてベーリンガーマンハイム社のビオチンラベリング
- 10 キットを用いて作製したビオチン化抗IRG27C-2 IgGを反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (BIOSOURCE INTERNATIONAL社)と反応させた後、TMB Microwell Peroxidase Substrate System (KPL社)を用いて発色反応を行った。結果を図9に示した。本発明の抗IRG27抗体は、GSTには反応しないが、GST融合IR
- 15 G27には抗原濃度および検出抗体の濃度依存的に反応した。この結果から、本発明の抗IRG27抗体を用いてELISAの行えることが明らかとなった。

実施例12

肝癌マウスの血中及び尿中のIRG27タンパク質のELISAによる検出

- 20 Raji細胞等のヒトリンパ腫由来の癌細胞をC57B6等のマウスの腹腔に投与し、腹水で癌細胞を増殖させる。その結果、ヒト癌患者において癌細胞に対してCTLが誘導されるのと同様に、ヒト癌細胞に対する細胞障害性T細胞(CTL)がマウスにおいて誘導され、該CTLが癌細胞を傷害し、その結果血中や尿中にヒト癌細胞由来のIRG27の放出されることが考えられる。従って、癌細胞接種後、任意の期
- 25 間で血液や尿を採取し、前記実施例11に記載のELISA法に供することによって、IRG27のタンパク質を検出することができる。

実施例 13

癌患者の尿を用いた I R G 2 7 タンパク質の E L I S A による検出

癌患者及び健常者の尿を実施例 12 と同様に E L I S A に供することによって、癌患者の尿で有意に I R G 2 7 タンパク質が蓄積していることが判定できる。

- 5 具体的には、例えば膀胱癌患者や腎癌患者の尿を採取し、遠心後、上清を集め、検出する患者尿の量を段階的に増やして実施例 11 に記載の如き E L I S A を行う。健常人に較べ有意に I R G 2 7 タンパク質が癌患者で検出されるため、受診者の中から癌を有する患者を選別することが可能となる。

10 配列表フリーテキスト

配列番号：4 に記載の塩基配列の第 1 2 2 番目及び第 1 3 6 番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

配列番号：19 に記載の塩基配列の第 1 3 1 番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

- 15 配列番号：20 に記載の塩基配列の第 7 4 番目及び第 8 7 番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

配列番号：21 に記載の塩基配列の第 2 4 番目、第 3 4 番目、第 4 5 番目、第 6 5 番目、第 6 6 番目、第 7 0 番目、第 7 3 番目、第 7 4 番目、第 8 4 番目、第 8 6 番目、第 8 9 番目、第 1 0 9 番目、第 1 1 4 番目及び第 1 2 3 番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

- 20 配列番号：23 に記載の塩基配列の第 1 7 番目、第 6 2 番目、第 9 9 番目、第 1 1 1 番目、第 1 2 5 番目、第 1 2 9 番目及び第 1 7 0 番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

- 配列番号：24 に記載の塩基配列の第 1 7 番目、第 6 2 番目、第 9 9 番目、第 1 1 1 番目、第 1 2 5 番目、第 1 2 9 番目及び第 1 7 0 番目の塩基は、決定できなかった塩基である。
- 25

配列番号：26 に記載の塩基配列の第 8 番目、第 4 1 番目及び第 8 7 番目の塩基は

、決定できなかった塩基である。

配列番号：28に記載の塩基配列の第63番目、第75番目、第108番目、第158番目、第179番目及び第189番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

- 5 配列番号：30に記載の塩基配列の第15番目、第28番目及び第41番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

配列番号：34に記載の塩基配列の第11番目、第12番目、第68番目、第70番目、第89番目、第146番目、第169番目、第177番目、第179番目、第186番目、第191番目及び第196番目の塩基は、決定できなかった塩基である

10 。

配列番号：36に記載の塩基配列の第102番目、第111番目、第137番目、第150番目、第158番目、第167番目及び第170番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

- 15 配列番号：39に記載の塩基配列の第108番目、第157番目、第181番目及び第209番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

配列番号：41に記載の塩基配列の第221番目の塩基は、決定できなかった塩基である。

産業上の利用性

- 20 本発明のIRG27遺伝子またはその一部、或いは該IRG27タンパク質に対する抗体は、広範な癌の診断に有用である。

請 求 の 範 囲

1. 以下の（a）及び（b）の特徴を有する遺伝子の正鎖及び逆鎖の、少なくとも連続した17塩基の配列よりなる1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらのDNAの標識体を有効成分とする、癌の診断薬。
- 5 （a）癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される
（b）正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる
2. 以下の（a）、（b）及び（c）の特徴を有する遺伝子の正鎖及び逆鎖の、少なくとも連続した17塩基の配列よりなる1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらのDNAの標識体を有効成分とする、癌の診断薬。
- 10 （a）癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される
（b）正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる
（c）配列番号：14～配列番号：29いずれか記載の塩基配列を含有する
- 15 3. 配列番号：3～配列番号：5いずれか記載の塩基配列よりなる遺伝子又はそのアレル変異体遺伝子に対するmRNAを特異的に検出し得る1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらのDNAの標識体を有効成分とする、癌の診断薬。
- 20 4. 配列番号：3～配列番号：5いずれか記載の塩基配列よりなる遺伝子又はそのアレル変異体遺伝子の正鎖及び逆鎖の、少なくとも連続した17塩基の配列よりなる1本鎖又は2本鎖DNA、あるいはこれらのDNAの標識体を有効成分とする、癌の診断薬。
- 25 5. ハイブリダイゼーション反応用のプローブ又はPCR反応用のプライマーであることを特徴とする、請求項1～4いずれか記載の癌の診断薬。

6. PCR反応用のプライマーの長さが17塩基～50塩基であることを特徴とする、請求項5記載の癌の診断薬。

7. 以下のA、B又はCのプライマーセット、あるいはこれらのプライマーの少なくとも17塩基以上の配列よりなる該プライマーセットを有効成分とする、請求項5又は6記載の癌の診断薬。

(A)

5'側プライマー配列: TGAGGGCGCAGAGGCAGGCAGCAT (配列番号: 8)

3'側プライマー配列: CCGAGCTGTGTCCAAGCAGGCTGT (配列番号: 9)

10 (B)

5'側プライマー配列: AAAGGCAAGCTGCTGGTGGGTCAT (配列番号: 10)

3'側プライマー配列: CTGTCCCAAAAAGCCGAAAGCCTC (配列番号: 11)

(C)

5'側プライマー配列: TTCCGCCCTGACTTCACTTGATAACAAAC (配列番号: 12)

15 3'側プライマー配列: CAGGCCGGATGAACTTGTCGT (配列番号: 13)

8. 以下の(a)及び(b)の特徴を有する遺伝子によりコードされるポリペプチドを特異的に認識する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体。

(a) 癌抑制因子p53の不活化により発現が誘導される

20 (b) 正常組織と比較して癌組織において発現の上昇が認められる

9. 配列番号: 14～配列番号: 29いずれか記載の塩基配列を含有する遺伝子によりコードされるポリペプチドを特異的に認識する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体。

25

10. 配列番号: 1又は配列番号: 2記載のアミノ酸配列よりなるポリペプチド又はそのアレル変異体を特異的に認識する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導

体。

1 1. 請求項 8～請求項 10 いずれか記載の抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体を有効成分とする、癌の診断薬。

5

1 2. 請求項 1～7 又は請求項 11 いずれか記載の癌の診断薬を用いることを特徴とする、癌の診断方法。

10 1 3. 診断対象として組織又は細胞を用いることを特徴とする、請求項 12 記載の癌の診断方法。

1 4. 診断対象として血液、唾液を含む体液または尿を用いることを特徴とする、請求項 12 記載の癌の診断方法。

15 1 5. 固形癌を診断するための、請求項 12～14 いずれか記載の癌の診断方法。

1 6. 腎癌又は膀胱癌を含む泌尿器系の癌を診断するための、請求項 12～15 いずれか記載の癌の診断方法。

20 1 7. 配列番号：14～配列番号：29 いずれか記載の塩基配列を含有し、かつ癌抑制因子 p 53 の不活化により発現が誘導される遺伝子。

1 8. 配列番号：30～配列番号：41 いずれか記載の塩基配列を含有し、かつ癌抑制因子 p 53 の不活化により発現が抑制される遺伝子。

1/9

図 1

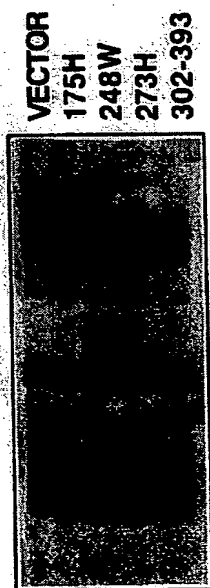


図 2

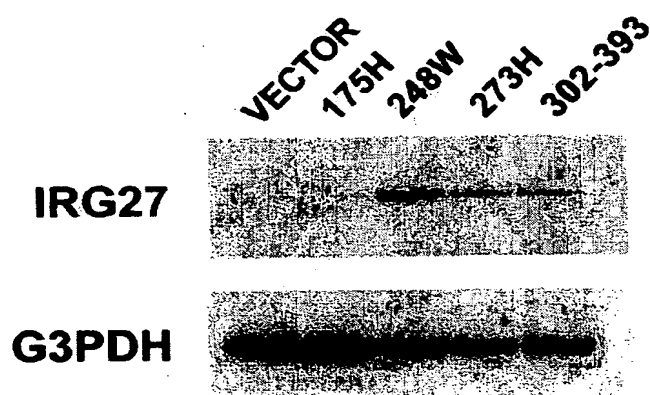
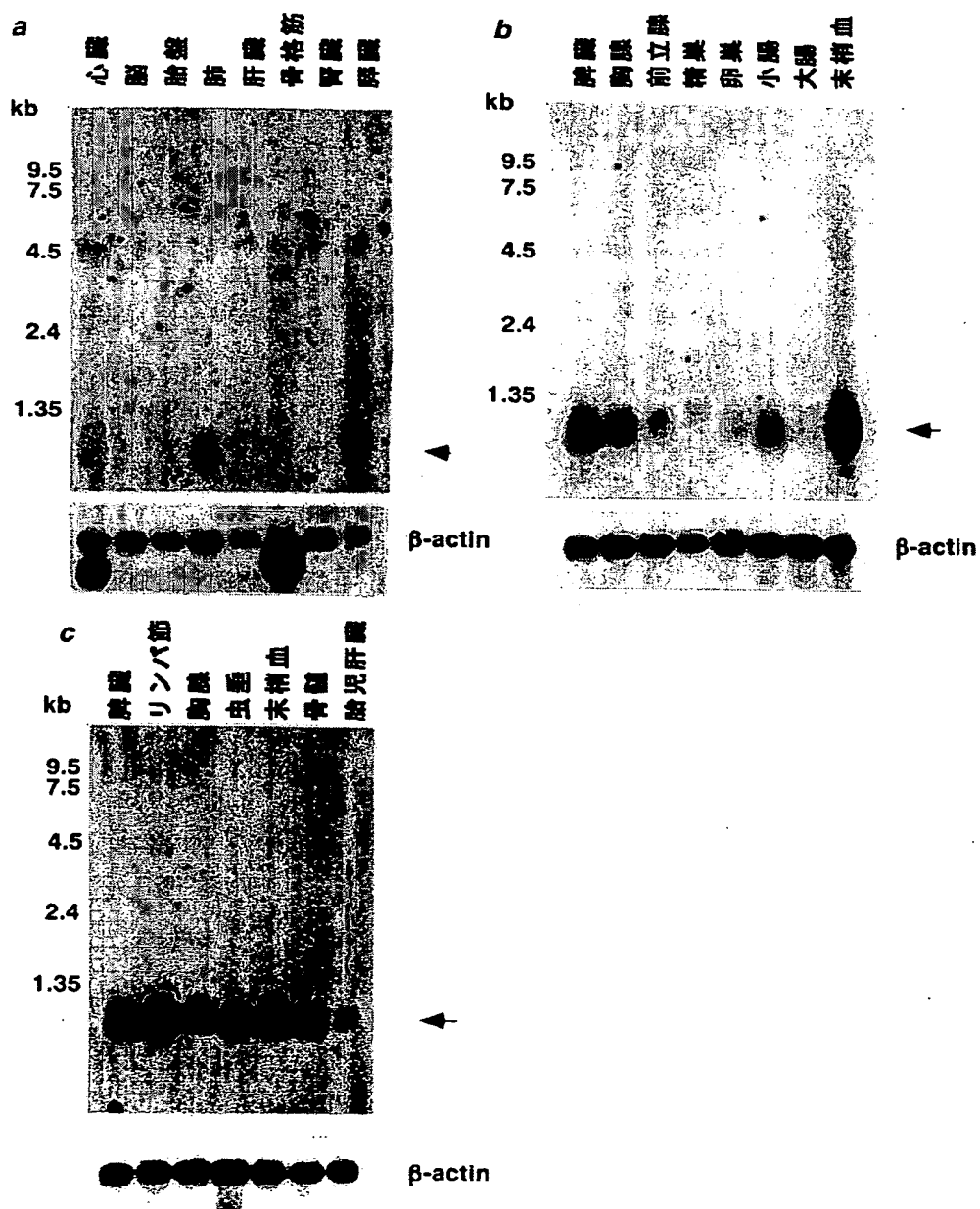


図 3



a: Human, b: Human II, c: Human Immune System

4/9

⊠ 4

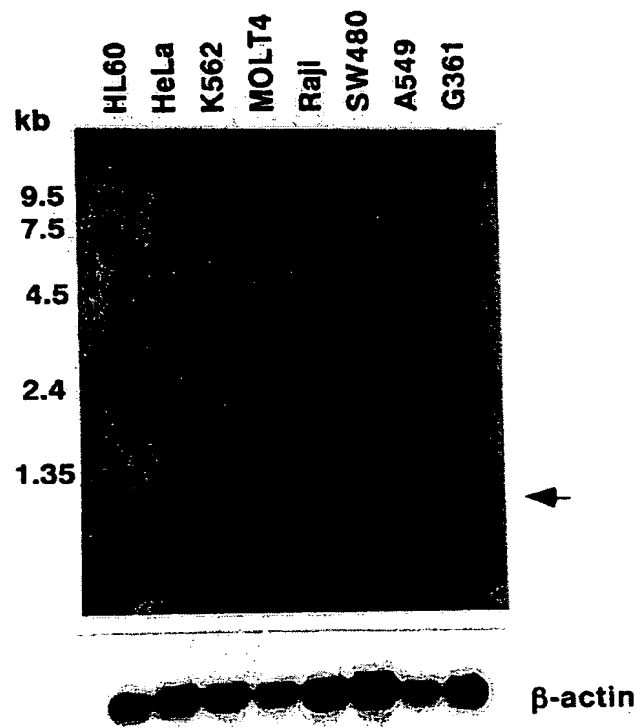
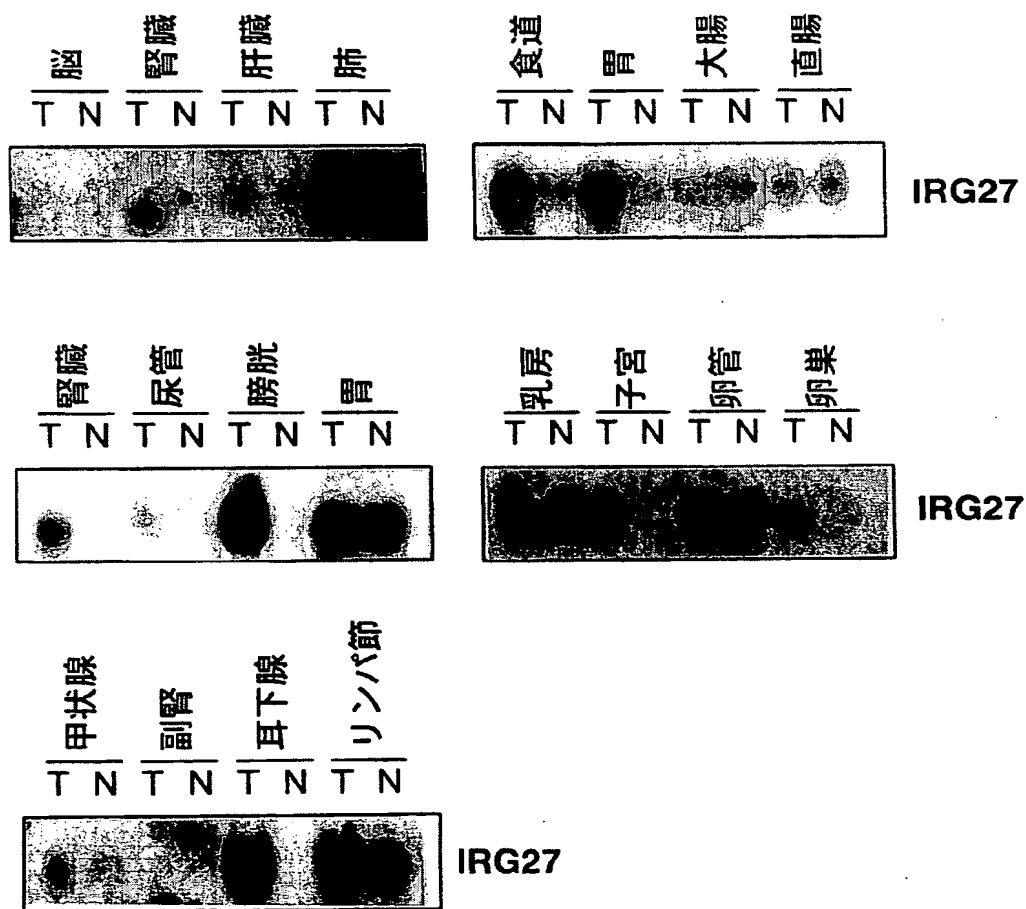


図 5



6/9

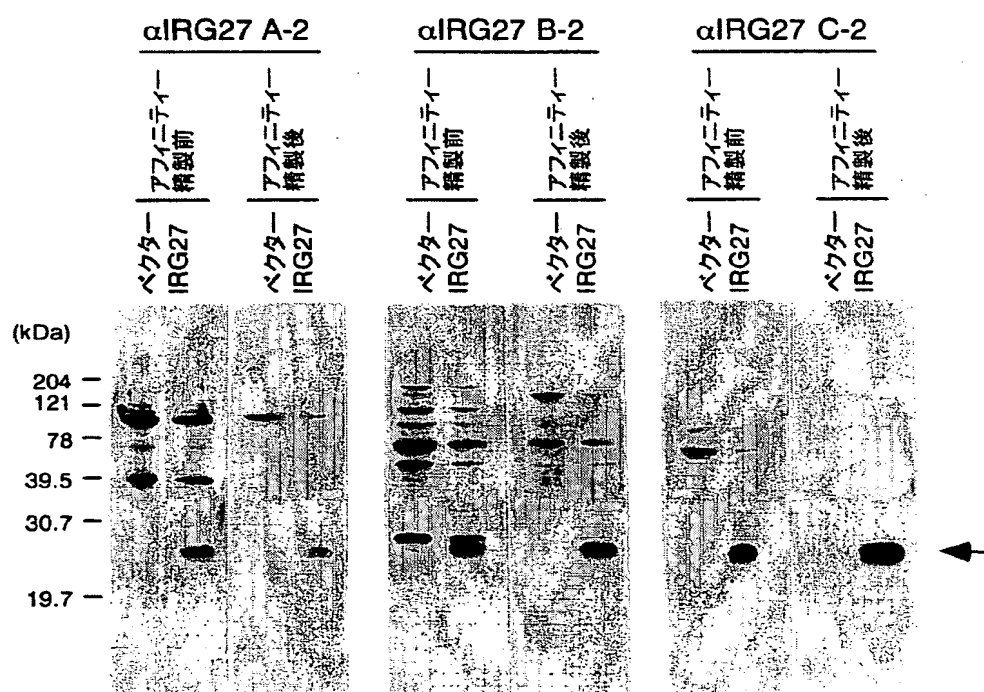
☒ 6

1	2	3	4
<u>T</u>	<u>N</u>	<u>T</u>	<u>N</u>

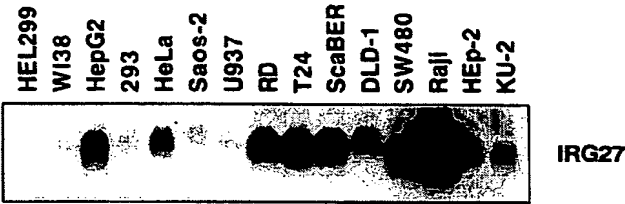


IRG27

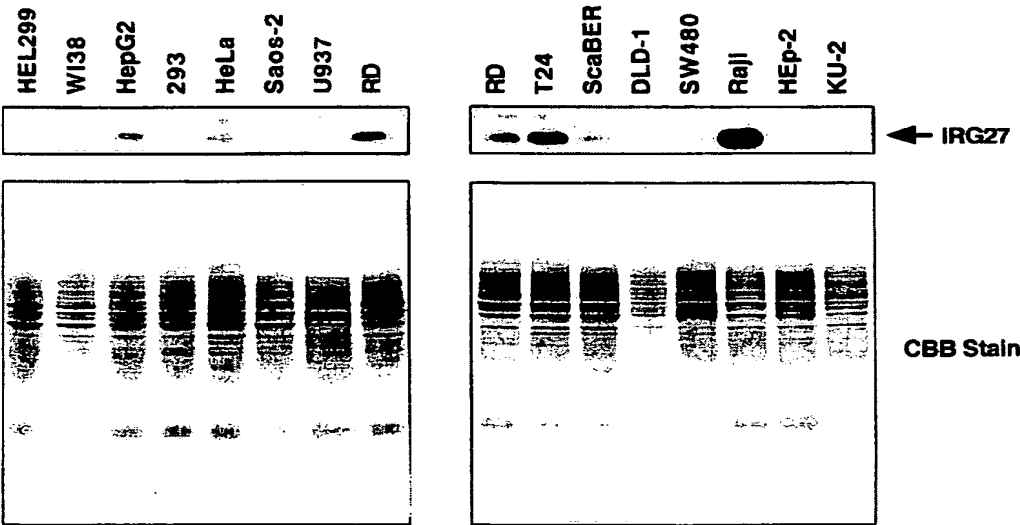
図 7



Northern Blotting

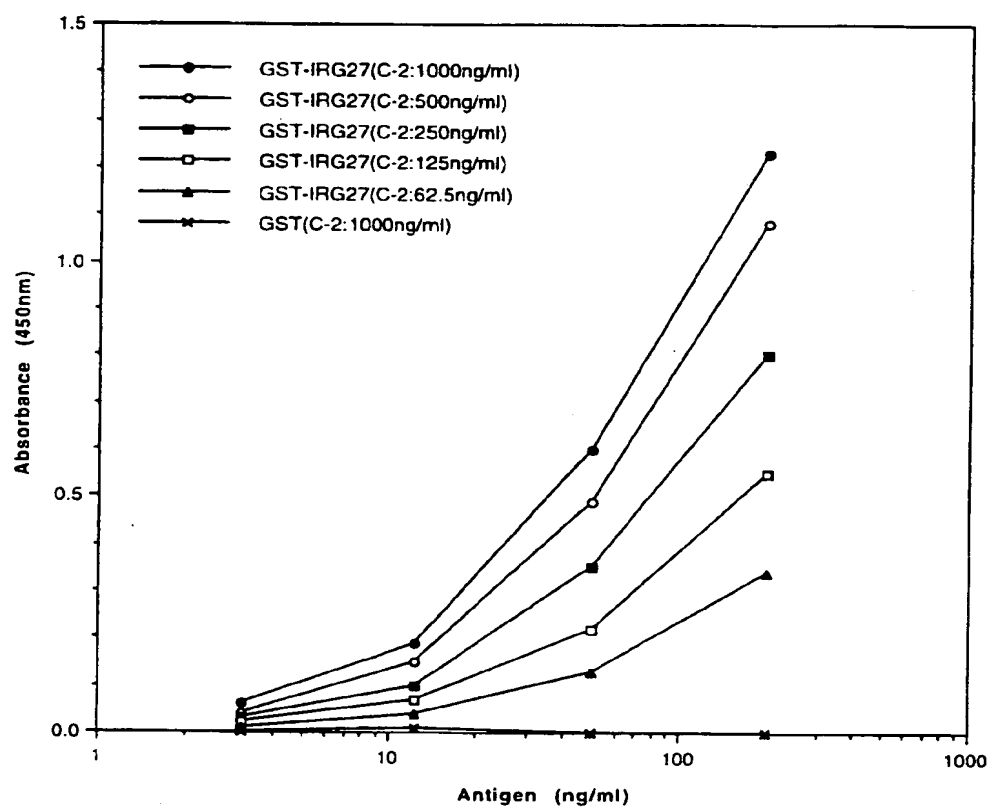


Western Blotting



9/9

図 9



SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited.

<120> Gene of IRG27 polypeptide or antibody thereof, or application thereof
for diagnosis

5 <130> 533061

<150> Japan: 99-093641

<151> 31.03.99

<160> 41

10 <210> 1

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

15 Met Ala Gly Ser Arg Glu Val Val Ala Met Asp Cys Glu Met Val Gly

5

10

15

Leu Gly Pro His Arg Glu Ser Gly Leu Ala Arg Cys Ser Leu Val Asn

20

25

30

Val His Gly Ala Val Leu Tyr Asp Lys Phe Ile Arg Pro Glu Gly Glu

20

35

40

45

Ile Thr Asp Tyr Arg Thr Arg Val Ser Gly Val Thr Pro Gln His Met

50

55

60

Val Gly Ala Thr Pro Phe Ala Val Ala Arg Leu Glu Ile Leu Gln Leu

65

70

75

80

25 Leu Lys Gly Lys Leu Val Val Gly His Asp Leu Lys His Asp Phe Gln

85

90

95

Ala Leu Lys Glu Asp Met Ser Gly Tyr Thr Ile Tyr Asp Thr Ser Thr

2/31

100 105 110
 Asp Arg Leu Leu Trp Arg Glu Ala Lys Leu Asp His Cys Arg Arg Val
 115 120 125
 Ser Leu Arg Val Leu Ser Glu Arg Leu Leu His Lys Ser Ile Gln Asn
 5 130 135 140
 Ser Leu Leu Gly His Ser Ser Val Glu Asp Ala Arg Ala Thr Met Glu
 145 150 155 160
 Leu Tyr Gln Ile Ser Gln Arg Ile Arg Ala Arg Arg Gly Leu Pro Arg
 165 170 175
 10 Leu Ala Val Ser Asp
 180

 <210> 2
 <211> 181
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Met Ala Gly Ile Pro Glu Val Val Ala Met Asp Cys Glu Met Val Gly
 5 10 15
 20 Leu Gly Pro Gln Arg Val Ser Gly Leu Ala Arg Cys Ser Ile Val Asn
 20 25 30
 Ile His Gly Ala Val Leu Tyr Asp Lys Tyr Ile Arg Pro Glu Gly Glu
 35 40 45
 Ile Thr Asp Tyr Arg Thr Gln Val Ser Gly Val Thr Pro Gln His Met
 25 50 55 60
 Val Arg Ala Thr Pro Phe Gly Glu Ala Arg Leu Glu Ile Leu Gln Leu
 65 70 75 80

3/31

Leu Lys Gly Lys Leu Val Val Gly His Asp Leu Lys His Asp Phe Asn
 85 90 95
 Ala Leu Lys Glu Asp Met Ser Lys Tyr Thr Ile Tyr Asp Thr Ser Thr
 100 105 110
 5 Asp Arg Leu Leu Trp His Glu Ala Lys Leu Gln Tyr Tyr Ser Arg Val
 115 120 125
 Ser Leu Arg Leu Leu Cys Lys Arg Leu Leu His Lys Asn Ile Gln Asn
 130 135 140
 Asn Trp Arg Gly His Cys Ser Val Glu Asp Ala Arg Ala Thr Met Glu
 10 145 150 155 160
 Leu Tyr Lys Ile Ser Gln Arg Leu Arg Ala Gln Arg Gly Leu Pro Cys
 165 170 175
 Pro Gly Thr Ser Asp
 180
 15
 <210> 3
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 3
 gcaccctgac atggagcctg ccagctccgt cagccctgac tcggcccgga gctgagctcc 60
 ccaccigccg gtagcccagg agatggagca gcccagccca cgtgcccggc ctccgcgcc 120
 tgacttcact tgataacaaa ctgaaactg aaacagggtc gggatgccga tgccggcttg 180
 gagttagaga tgagtcaccg ctgagagcag ctgcagtagc tgagcagtgg cagcagagag 240
 25 gcagacgtga gctgagggcg cagaggcagg cagcatctct gaggggtcccc aaggaac 297
 atg gct ggg agc cgt gag gtg gtg gcc atg gac tgc gag atg gtg ggg 345
 Met Ala Gly Ser Arg Glu Val Val Ala Met Asp Cys Glu Met Val Gly

4/31

	5	10	15	
	ctg ggg ccc cac cgg gag agt ggc ctg gct cgt tgc agc ctc gtg aac	393		
	Leu Gly Pro His Arg Glu Ser Gly Leu Ala Arg Cys Ser Leu Val Asn			
	20	25	30	
5	gtc cac ggt gct gtg ctg tac gac aag ttc atc cgg cct gag gga gag	441		
	Val His Gly Ala Val Leu Tyr Asp Lys Phe Ile Arg Pro Glu Gly Glu			
	35	40	45	
	atc acc gat tac aga acc cgg gtc agc ggg gtc acc cct cag cac atg	489		
	Ile Thr Asp Tyr Arg Thr Arg Val Ser Gly Val Thr Pro Gln His Met			
10	50	55	60	
	gtg ggg gcc aca cca ttt gcc gtg gcc agg cta gag atc ctg cag ctc	537		
	Val Gly Ala Thr Pro Phe Ala Val Ala Arg Leu Glu Ile Leu Gln Leu			
	65	70	75	80
	ctg aaa ggc aag ctg gtg gtg ggt cat gac ctg aag cac gac ttc cag	585		
15	Leu Lys Gly Lys Leu Val Val Gly His Asp Leu Lys His Asp Phe Gln			
	85	90	95	
	gca ctg aaa gag gac atg agc ggc tac aca atc tac gac acg tcc act	633		
	Ala Leu Lys Glu Asp Met Ser Gly Tyr Thr Ile Tyr Asp Thr Ser Thr			
	100	105	110	
20	gac agg ctg ttg tgg cgt gag gcc aag ctg gac cac tgc agg cgt gtc	681		
	Asp Arg Leu Leu Trp Arg Glu Ala Lys Leu Asp His Cys Arg Arg Val			
	115	120	125	
	tcc ctg cgg gtg ctg agt gag cgc ctc ctg cac aag agc atc cag aac	729		
	Ser Leu Arg Val Leu Ser Glu Arg Leu Leu His Lys Ser Ile Gln Asn			
25	130	135	140	
	agc ctg ctt gga cac agc tcg gtg gaa gat gcg agg gca acg atg gag	777		
	Ser Leu Leu Gly His Ser Ser Val Glu Asp Ala Arg Ala Thr Met Glu			

5/31

145 150 155 160
ctc tat caa atc tcc cag aga atc cga gcc cgc cga ggg ctg ccc cgc 825
Leu Tyr Gln Ile Ser Gln Arg Ile Arg Ala Arg Arg Gly Leu Pro Arg
 165 170 175
5 ctg gct gtg tca gac tgaagcccca tccagcccg tccgcaggga ctagaggctt 880
Leu Ala Val Ser Asp
 180
tcggcttttt gggacagcaa ctaccttgct ttgggaaaat acatttttaa tagtaaagt 940
gctctatatt ttctctacgc ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 981
10
 <210> 4
 <211> 869
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
15 <220>
 <221> unsure
 <222> 122
 <223> This nucleotide was undetermined.
 <220>
20 <221> unsure
 <222> 136
 <223> This nucleotide was undetermined.
 <400> 4
tcttgactga gaatgggtgcc acgtgtggtc tgtaagtagg tggtcagctg tagctggatg 60
25 tgtgccttga aaggctgaca agtttgccct gagtgactca cctactgtca cctgatccaa 120
cngatttgtg ggcgintgcc gatgggtgac gccagttaaa gcattctcga ggggccccaa 180
ggaac atg gct ggg agc cgt gag gtg gtg gcc atg gac tgc gag atg 227

[illegible]

7/31

Gln Asn Ser Leu Leu Gly His Ser Ser Val Glu Asp Ala Arg Ala Thr
 145 150 155
 atg gag ctc tat caa atc tcc cag aga atc cga gcc cgc cga ggg ctg 707
 Met Glu Leu Tyr Gln Ile Ser Gln Arg Ile Arg Ala Arg Arg Gly Leu
 5 160 165 170
 ccc cgc ctg gct gtg tca gac tgaagcccca tccagcccg tccgcaggga 758
 Pro Arg Leu Ala Val Ser Asp
 175 180
 ctagaggctt tcggcttttt gggacagcaa ctaccttgct ttgggaaaat acatttttaa 818
 10 tagtaaagtg gctctatatt ttctctacgc ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 869

 <210> 5
 <211> 881
 <212> DNA
 15 <213> Mus musculus
 <400> 5
 caacctgccca gcccccttac ctggccagcc ttgaggagat ggaacagccc aggctacaag 60
 gcctgcccccc actcctcaac ttccttgat aatgaaccag aaactgaaac taaaacaggc 120
 aggctccccg ttagagatga gtcacttccc aaagtgactg aagtagccga gaagtggaaa 180
 20 cagaggggca gaagagaacc cagggcactg agacagggct ttctgagggt cgccaaggag 240
 c atg gca ggc atc cca gag gtg gtg gcc atg gac tgt gag atg gtg 286
 Met Ala Gly Ile Pro Glu Val Val Ala Met Asp Cys Glu Met Val
 5 10 15
 ggg ctt ggg cct caa agg gtg agt ggc ctc gcc cgc tgc agc att gtg 334
 25 Gly Leu Gly Pro Gln Arg Val Ser Gly Leu Ala Arg Cys Ser Ile Val
 20 25 30
 aac atc cat ggc gca gtc ctg tat gac aag tac atc cga ccc gag gga 382

8/31

	Asn Ile His Gly Ala Val Leu Tyr Asp Lys Tyr Ile Arg Pro Glu Gly	
	35 40 45	
	gag atc acg gac tac aga acc caa gtc agc ggg gtc acg cct cag cac	430
	Glu Ile Thr Asp Tyr Arg Thr Gln Val Ser Gly Val Thr Pro Gln His	
5	50 55 60	
	atg gtg agg gcc acg cca ttt ggt gaa gcc agg cta gag atc ctg cag	478
	Met Val Arg Ala Thr Pro Phe Gly Glu Ala Arg Leu Glu Ile Leu Gln	
	65 70 75	
	ctt ctg aaa ggc aag ctg gtg gtg ggc cat gac ctg aag cac gac ttc	526
10	Leu Leu Lys Gly Lys Leu Val Val Gly His Asp Leu Lys His Asp Phe	
	80 85 90 95	
	aat gcc ctg aag gag gat atg agc aag tac acc atc tat gac acg tcc	574
	Asn Ala Leu Lys Glu Asp Met Ser Lys Tyr Thr Ile Tyr Asp Thr Ser	
	100 105 110	
15	aca gac agg ctg ctg tgg cat gag gcc aag ctg cag tac tac agc cga	622
	Thr Asp Arg Leu Leu Trp His Glu Ala Lys Leu Gln Tyr Tyr Ser Arg	
	115 120 125	
	gtg tcc ctg agg ctg ctg tgt aag cgc ctg cta cac aag aac atc cag	670
	Val Ser Leu Arg Leu Leu Cys Lys Arg Leu Leu His Lys Asn Ile Gln	
20	130 135 140	
	aac aac tgg cgg ggc cac tgc tct gtg gaa gat gcc agg gcc aca atg	718
	Asn Asn Trp Arg Gly His Cys Ser Val Glu Asp Ala Arg Ala Thr Met	
	145 150 155	
	gag ctc tac aaa atc tct cag cga ctc aga gcc cag cga ggg ctg cct	766
25	Glu Leu Tyr Lys Ile Ser Gln Arg Leu Arg Ala Gln Arg Gly Leu Pro	
	160 165 170 175	
	tgc cct ggg acg tca gac tgaacttcat cctcatccag ggtagaagc	814

Cys Pro Gly Thr Ser Asp

180

tgccactcct caagttctcc atgaatgaga cctgtttcta acaaccactg ccaccaacca 874

ccgcaat 881

5

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10 <400> 6

gcatggctgg gagcgtgatg tggt 24

<210> 7

<211> 26

15 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

ctctttgtgca ggaggcgctc actcag 26

20 <210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

25 tgagggcgca gaggcaggca gcat 24

<210> 9

10/31

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

5 ccgagctgtg tccaagcagg ctgt

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<400> 10

aaaggcaagc tgggtggtggg tcat

24

<210> 11

15 <211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ctgtcccaaa aagccgaaag cctc

24

20

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25 <400> 12

ttccgcccct gatttcactt gataacaaac

30

11/31

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5 <400> 13

caggccggat gaacttgatg t 21

<210> 14

<211> 197

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

agccagcgaa gaaggtaaag aatgtgaccc agattgaacc tttctgcttg gagactgaca 60

ggagaggtgc tctgaaggca cagacttgga agcaccagct ggaagaagaa ctgagacagc 120

15 agaaagaagc agcttggttc aaggctcgtc caaacaccgt catctctcag gagccctttg 180

ttccccaaaa aaaaaaa 197

<210> 15

<211> 335

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

agccagcgaa ctacaagaac agagggattc ttgactcag aaactacagg aagtagaaat 60

tcggaacaaa gacctggagg gacaactgtc tgacttagag caacgtctgg agaaaagtca 120

25 gaatgaacaa gaagcttttc gcaataacct gaagacactc ttagaaattc tggatggaaa 180

gatatttgaa ctaacagaat tacgtgataa cttggccaag ctactagaat gcagctaagg 240

aaagtgaaat ttcagtgcc attaattaaa agatacactg tctctcttca taggactgtt 300

12/31

taggctctgc atcaagattg cgcaaaaaaa aaaaa 335

<210> 16

<211> 254

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 16

agccagcgaa cacattccgg gttagaaata atagctctaa caaattgttt tgcgcgccta 60

gtctcatatt atcttctcaa caacgcaatt ttacagatga agaatccaag acacatagat 120

10 gtttggaac tttctcttat ctggttttta ataggcttga atccagatca ttgaactcta 180

aacaccagtg ctgtctgcat atagcagatt gtttatatgt taagtgtgaa tttcagtagt 240

gcaaaaaaaa aaaa 254

<210> 17

15 <211> 92

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

cgtggcaata atgggtgtaa gaaaatagtt tcttgggtat ttgtaacgta caaactatca 60

20 taaaaattct cctctttcgc aaaaaaaaaa aa 92

<210> 18

<211> 121

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<400> 18

cagaccgttc cgcagggacc agaggctttc ggcttttttg gacagcaact accttgcttt 60

13/31

tggagaatac atttttaata gtaaagtggc tctatatttt cttacgccca aaaaaaaaaa 120

a 121

<210> 19

5 <211> 346

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

10 <222> 131

<223> This nucleotide was undetermined.

<400> 19

ctgagctagg acaaagtgtg aaacaatcta atccgatga cacttttaat agtagatttt 60

taatcagctt tgtgatttct ttaacagtta ttggtttatt caggcttttt attaaaaagg 120

15 tatatacatt ntctgtgaca tacaaagtta aaagtctctt attattgctg attgtactgg 180

ttgttgcttg ttgactgtac tattcagaatg gctttatgct tttgtgtatt ttatgtcacc 240

tagatctaatt tctgaaaaca ttgtaataaa ataattagct ataatggcaa aaaaaaaaaa 300

aaaaaaaaaa atcaatcttt tcgcaaaaaa aaaaaa 346

20 <210> 20

<211> 153

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

25 <221> unsure

<222> 74

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 87

<223> This nucleotide was undetermined.

5 <400> 20

```
catcagcaac cattctttta ctggaatcac tacatgaaat gtaacatcat aacacaattc      60
cagtattaac tatnaaccag actccanccg gagcactcaa atcacttctg tcttctttct      120
agttgcctaa gtcccgctct gctgtccgat cac                                  153
```

10 <210> 21

<211> 139

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

15 <221> unsure

<222> 24

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

20 <222> 34

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 45

25 <223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

- <222> 65
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>
<221> unsure
- 5 <222> 66
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>
<221> unsure
<222> 70
- 10 <223> This nucleotide was undetermined.
<220>
<221> unsure
<222> 73
<223> This nucleotide was undetermined.
- 15 <220>
<221> unsure
<222> 74
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>
- 20 <221> unsure
<222> 84
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>
<221> unsure
- 25 <222> 86
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>

16/31

<221> unsure

<222> 89

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

5 <221> unsure

<222> 109

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

10 <222> 114

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 123

15 <223> This nucleotide was undetermined.

<400> 21

tttttttttt	ttcggggtag	gacntcctca	tgntttctt	atgcncgttt	tgctatctac	60
------------	------------	------------	-----------	------------	------------	----

aaatnnaatn	ctnnaaatgg	actntnaang	gctgaaggct	tatcaagtng	catnaacact	120
------------	------------	------------	------------	------------	------------	-----

acnacaaata	tggtgatc	139
------------	----------	-----

20

<210> 22

<211> 111

<212> DNA

<213> Homo sapiens

25 <400> 22

tttttttttt	tttgccagaa	cagagactca	agccagggtt	aatgatcatt	gtctagtttt	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

cagagcccag	aggctccaag	atttgccagc	ctaggtgtac	acaagcggtc	a	111
------------	------------	------------	------------	------------	---	-----

- <210> 23
- <211> 175
- <212> DNA
- 5 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> unsure
- <222> 17
- <223> This nucleotide was undetermined.
- 10 <220>
- <221> unsure
- <222> 62
- <223> This nucleotide was undetermined.
- <220>
- 15 <221> unsure
- <222> 99
- <223> This nucleotide was undetermined.
- <220>
- <221> unsure
- 20 <222> 111
- <223> This nucleotide was undetermined.
- <220>
- <221> unsure
- <222> 125
- 25 <223> This nucleotide was undetermined.
- <220>
- <221> unsure

18/31

<222> 129

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

5 <222> 170

<223> This nucleotide was undetermined.

<400> 23

ttttttttt ttgtcnaga aaggaaaagg atttattaca ccatttccag gacagggacc 60

cntgggcagt ggctgggttc agtggttctca cgctcagang aagaaaaggc ngtggtgaac 120

10 accncccnna ctgccttacc ctgatctaaa ctacaccatc tcctccccc n aggaa 175

<210> 24

<211> 175

<212> DNA

15 <213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> 17

<223> This nucleotide was undetermined.

20 <220>

<221> unsure

<222> 62

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

25 <221> unsure

<222> 99

<223> This nucleotide was undetermined.

19/31

<220>

<221> unsure

<222> 111

<223> This nucleotide was undetermined.

5 <220>

<221> unsure

<222> 125

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

10 <221> unsure

<222> 129

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

15 <222> 170

<223> This nucleotide was undetermined.

<400> 24

tttttttttt	tttgtcnaga	aaggaaaagg	atttattaca	ccatttccag	gacagggacc	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

cntgggcagt	ggctgggttc	agtgttctca	cgctcagang	aagaaaaggc	ngtgggtgaac	120
------------	------------	------------	------------	------------	-------------	-----

20	accncccnna	ctgccttacc	ctgatctaaa	ctacaccatc	tcctccccc	aggaa	175
----	------------	------------	------------	------------	-----------	-------	-----

<210> 25

<211> 89

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<400> 25

ttgctgacct	gtggacaaga	caatgggaca	gggataggca	gttcctccat	ccattcataa	60
------------	------------	------------	------------	------------	------------	----

20/31

ttgccaggca agatcttctg gccctcctga

89

<210> 26

<211> 132

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> 8

10 <223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 41

<223> This nucleotide was undetermined.

15 <220>

<221> unsure

<222> 87

<223> This nucleotide was undetermined.

<400> 26

20 tttttttntt ttgcacaagg gtaacttctt ctttggttaa ncaaataact ggacataatc 60

ttaaaggatt ccacctccat cgtcttncct aacttagatc ttcattgaga aattgggcaa 120

ggttaagttt ac 132

<210> 27

25 <211> 88

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

tgaccgcttg tacttccaaa aacttccctc agcattctat tgtgatgagg tttcaaatag 60

taaaccttca aggataaaac catcctca 88

5 <210> 28

<211> 209

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> unsure

<222> 63

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

15 <222> 75

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 108

20 <223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 158

<223> This nucleotide was undetermined.

25 <220>

<221> unsure

<222> 179

22/31

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 189

5 <223> This nucleotide was undetermined.

<400> 28

ttttttttct ttgcccatt catctttatt cctttattta atcctcccca tgtattatai 60

aanccttaggt atalnacttc tattacataa agaagtagta aaggcacnat gtttacttac 120

acaattacat gtagtgaatt agcacttttg taactcanag acatgaatgt caacaattnt 180

10 agagcaganc tcatttgacac ggicaccta 209

<210> 29

<211> 232

<212> DNA

15 <213> Homo sapiens

<400> 29

tttttttttt ttgacata gcaagtttat tcacaattcc ccaaatttgg aagcaaccac 60

ggtatctttc agcagataaa gagataaact gtggaacatc cagacaatag aatattaact 120

agtgctaaaa agaaataagc tagcaagcca taaaaagaca tgttgctaag tgaaagaagc 180

20 caatctgaag aggctataga ctgtatgatt ccacttacgt gacggtcacc ta 232

<210> 30

<211> 111

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

23/31

<222> 15

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

5 <222> 28

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 41

10 <223> This nucleotide was undetermined.

<400> 30

gaccgcttgt ggggntggct atgggggnag gggaggttga naaaggaagt tctcgacacc 60

agaaatgcat cggaggacca caatcagttc tatgctgcc aaaaaaaaaa a 111

15 <210> 31

<211> 206

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

20 cgtggcaata taagctaagg gaaaaggaat ttacagcaga ggaatgacac aagggaatgt 60

acagtagtag gaagtataaa gtgatTTTTA ggaatcataa ttagattcgt ttggttggaa 120

ggatgaagga cagaaactg taaataacct tgaatTTTtTt tctgtacaaa atggggattc 180

aataaatgtt tgtgaaaaaa aaaaaa 206

25 <210> 32

<211> 148

<212> DNA

24/31

<213> Homo sapiens

<400> 32

gaatacatgc taaaaggaat aatttacagc agcagtttca ttacattttt ctctccagtt 60
tttctagttc ccatctgaaa tgcaatgata agtaaagata tggaacatat ttcctacctg 120
5 gcaaaaaaca tgcttatiga acggtctg 148

<210> 33

<211> 273

<212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<400> 33

cgtcagtgac acataactaga ggggaccaa caaactacta aagcataagt acatatttta 60
gcataactgc taaatcacaa tgtaataaaa aggtttatta aagattgcta ttctttatgc 120
aatttttcta tactaaggat ttatgtatgc atgcataagt atacacctgt atgtatatat 180
15 aactattatt ttagtgatag tctgtgtatt ttacacacca gtgccacaaa ggggcaacct 240
tacaaatitt atctgtatgg caaaaaaaaaaaa aaa 273

<210> 34

<211> 208

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> 11

25 <223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

25/31

- <222> 12
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>
<221> unsure
- 5 <222> 68
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>
<221> unsure
<222> 70
- 10 <223> This nucleotide was undetermined.
<220>
<221> unsure
<222> 89
<223> This nucleotide was undetermined.
- 15 <220>
<221> unsure
<222> 146
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>
- 20 <221> unsure
<222> 169
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>
<221> unsure
- 25 <222> 177
<223> This nucleotide was undetermined.
<220>

26/31

<221> unsure

<222> 179

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

5 <221> unsure

<222> 186

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

10 <222> 191

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 196

15 <223> This nucleotide was undetermined.

<400> 34

tttttttttt nntgactaca acttaaaactt tatttacttg attgagagct tattgcacat	60
--	----

gaaatgtntn atgtggttga tcttaactnc gtttacattg acttctatgc tcaagattgt	120
---	-----

tcaattgctg ctgctgccgt tgtgtnttct ttcaggatca aggtggginc cttcatntna	180
---	-----

20 tctctncttt ntaatntctt cgctggct	208
-----------------------------------	-----

<210> 35

<211> 206

<212> DNA

25 <213> Homo sapiens

<400> 35

tttttttttt ttgagtaga taagaactgg attttaatcc caacattgcc atttaccagc	60
--	----

27/31

tgccaatac tgagctagtt actctaaaga gttcagtttt ctcatttgta caaataggat 120
ttgtctttcc atctcactga gttgtgatga gagtcatatg caacagcata tgaagaggct 180
agcaaaaggt atttaacaag cgggtca 206

5 <210> 36

<211> 208

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

10 <221> unsure

<222> 102

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

15 <222> 111

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 137

20 <223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 150

<223> This nucleotide was undetermined.

25 <220>

<221> unsure

<222> 158

28/31

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 167

5 <223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

<222> 170

<223> This nucleotide was undetermined.

10 <400> 36

tggattgtgc ggatgtcagg ggacattact gtigctaata aagtccaaag tggccaatgc	60
ctttctcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaatcctgc tncctcata ntgttataaa	120
aaaaatttac tgaaatnatg gactaaggcn ttacaanca ttatctnacn cctgggaaag	180
ggtgaggctc atataagcgc acaatcca	208

15

<210> 37

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20 <400> 37

tttttttttt ttctggcagc aagtccaata ttctttaata cttatcaagc aaagatttga	60
aaataactac aatgtaaact ttattttaaa tattttgagt tgcttgcagg atgaaaatag	120
gagaagagag ctgtgcttag aacataacat ataaattaaa cgatgccaaa tggagagcct	180
tcttaacta tatatatata	200

25

<210> 38

<211> 103

29/31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

ttttttttt ttgcatcat ctactcaaag ttatttgac tgaacaaagg ctgaatacag 60
5 agatccaagc catgaggagt acatgagggtg tggcgctaa cta 103

<210> 39

<211> 307

<212> DNA

10 <213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> 108

<223> This nucleotide was undetermined.

15 <220>

<221> unsure

<222> 157

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

20 <221> unsure

<222> 181

<223> This nucleotide was undetermined.

<220>

<221> unsure

25 <222> 209

<223> This nucleotide was undetermined.

<400> 39

30/31

tttttttttt ttttcgctgc atggattttt aattaaatac cacttcataa tgttatttgc 60
 acctagiact tttttttttt ttttcgittt tttttttttt tttttttncg atatgcttat 120
 gttttattta tgttaggtggc atttaaaata catgatntgt ttagggttac attgtccaca 180
 naaagcatca aataccactc ctctcccccnc caaaaccaa taaacaaagc caactctttg 240
 5 gcaacagttg tgtcaaataa aatcccaggt cacacttggt tctggctccc aagcctgggt 300
 cactgac 307

<210> 40

<211> 191

10 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

tcgtcagtga caaatccagg aaatgaatgt tgctgatagg gataaatctt gaggctgagg 60
 gcgggtggta cagatgtgta tgggaaaccc caacccttat atattgtaaa tagatgggct 120
 15 gggctaaaca ttgttgccgt ttcatacttc taccaactca gcttttacac aataaagctc 180
 tactgtctct a 191

<210> 41

<211> 264

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> 221

25 <223> This nucleotide was undetermined.

<400> 41

tttttttttt ttggcaagg gtaacttctt ctttattaaa gcaaataact ggacataatc 60

31/31

ttaaaggatt ccacctccat cgtctttcct aacttagatc ttcatlgaga aatigggcaa	120
ggttaagttt acttttttct agtgctgcgg ttttggtcg tcttggtagt ctcactttca	180
ttctgattc tggttctgga acttcatgat cactttcaga ntcggcttca gcagtctgac	240
acctcctgtt cgtcctagct caga	264

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01796

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Brian T. Pentecost, "Expression and estrogen regulation of the HEM45 mRNA in human tumor lines and in the rat uterus", J. Steroid Biochem Molec. Biol. (1998), Vol. 64, No. 1/2, p. 25-33	8-10, 17, 18
X	Celine Gongora et al., "Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein", The Journal of Biological Chemistry (1997), Vol. 272, No. 3, p. 19457-19463	8-10, 17, 18
A	Biosis Acc. No.: 199900038865 & Gustafsson Britt et al., "Overexpression of MDM2 in acute childhood lymphoblastic leukemia", Pediatric Hematology and Oncology (1998), Vol. 15, No. 6, p. 519-526	1-11, 17, 18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 26 May, 2000 (26.05.00)

Date of mailing of the international search report
 06 June, 2000 (06.06.00)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01796

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12-16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject matter of claims 12-16 relates to a method for diagnosis of the human body.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/01796

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/12, C12Q 1/68, C07K 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Brian T. Pentecost, "Expression and estrogen regulation of the HEM45 mRNA in human tumor lines and in the rat uterus", J. Steroid Biochem. Molec. Biol. (1998), Vol. 64, No. 1/2, p. 25-33	8-10, 17, 18
X	Celine Gongora et al., "Molecular cloning of a new interferon-induced PML nuclear body-associated protein", The Journal of Biological Chemistry (1997), Vol. 272, No. 31, p. 19457-19463	8-10, 17, 18

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.05.00

国際調査報告の発送日

06.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一



4N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Biosis Acc.No.:199900038865 & Gustafsson Britt et al., "Overexpression of MDM2 in acute childhood lymphoblastic leukemia", Pediatric Hematology and Oncology (1998), Vol. 15 , No. 6 , p. 519-526	1-11, 17, 18

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 12-16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

人の診断方法である。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。